

**ENZYMHISTOCHEMISCHE UND  
AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN  
ZUM EINFLUSS EINER PARTIELLEN  
HEPATEKTOMIE AUF DIE  
LEBERTUMORINDUKTION DURCH  
DIATHYLNITROSAMIN (DÄNA)**

**I. WIRKUNG EINES PROLIFERATIONSREIZES IM  
FRÜHSTADIUM DER DÄNA-FÜTTERUNG**

Dorothea Metzger

---

1977

---





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41555625\\_0032](https://archive.org/details/IA41555625_0032)



AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

---

ENZYMHISTOCHEMISCHE UND AUTORADIOGRAPHISCHE  
UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS EINER PARTIELLEN  
HEPATEKTOMIE AUF DIE LEBERTUMORINDUKTION  
DURCH DIÄTHYLNITROSAMIN (DÄNA).

I. WIRKUNG EINES PROLIFERATIONSREIZES IM  
FRÜHSTADIUM DER DÄNA - FÜTTERUNG

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten  
Medizin verfasst und dem Fachbereich Medizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dorothea Metzger

aus München

1977



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Eder

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 5. 1977

Herrn Professor Dr. H.M. Rabes danke ich für die Themenstellung, Anleitung und Beratung bei dieser Arbeit.

Herrn Dr. H.V. Tuczek sowie Fräulein R. Kerler, Frau M. Kirkpatrick, Frau Dr. S. Czichos, Fräulein R. Casper, Herrn H. Hampe und Frau L. Döhle danke ich für ihre Unterstützung.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ra 101/19) durchgeführt.



## INHALTSVERZEICHNIS

| <u>1. ALLGEMEINER TEIL</u>                                                            | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1.1. ZUR WIRKUNGSWEISE DES DIÄTHYLNITROSAMINS                                         |       |
| 1.1.1. Eigenschaften des Diäthylnitrosamins                                           | 1     |
| 1.1.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung                                                       | 2     |
| 1.1.3. DÄNA-Metabolismus                                                              | 3     |
| 1.1.4. Alkylierung der Nukleinsäuren                                                  | 5     |
| 1.1.5. Alkylierung von Cytoplasmabestandteilen                                        | 7     |
| 1.1.6. Histologische Veränderungen der Leber                                          | 8     |
| 1.1.7. Bedeutung der hyperplastischen Knötchen                                        | 13    |
| 1.1.8. Enzymhistochemische Veränderungen                                              | 15    |
| 1.1.9. Glykogenstoffwechsel                                                           | 21    |
| 1.1.10. Protein- und Nukleinsäurestoffwechsel                                         | 24    |
| 1.2. EINFLUSS DER PROLIFERATION AUF DIE KANZERO-<br>GENESE                            |       |
| 1.2.1. Nachweis der Tumorentstehung nach Prolife-<br>rationsreiz (Literaturbeispiele) | 28    |
| 1.2.2. Ablauf der Regeneration                                                        | 31    |
| 1.2.3. Verschiedene Empfindlichkeit der Zell-<br>zyklusphasen                         | 34    |
| 1.2.4. Auswirkungen des DÄNA auf die Proliferation                                    | 35    |
| 1.2.5. Tumorstadium und Leberregeneration                                             | 36    |
| 1.3. ALLGEMEINE FRAGESTELLUNG UND SKIZZIERUNG<br>DES VERSUCHSMODELLS                  | 40    |
| <u>2. EXPERIMENTELLER TEIL</u>                                                        |       |
| 2.1. MATERIAL UND METHODE                                                             |       |
| 2.1.1. Verwendete Versuchstiere und DÄNA-Fütterung                                    | 43    |
| 2.1.2. Durchführung der Teilhepatektomie                                              | 43    |
| 2.1.3. Markierung mit $^3\text{H}$ -TdR                                               | 45    |

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.4. Anfertigung histologischer Schnitte                                                                    | 45 |
| 2.1.5. Nachweis der Enzymaktivitäten und Herstellung von Autoradiographien                                    | 46 |
| 2.1.6. Mikroskopische Auswertung                                                                              | 47 |
| 2.1.7. Ermittlung der Überlebenszeit der Kontrolltiere                                                        | 50 |
| 2.1.8. Statistische Auswertung                                                                                | 50 |
| 2.2. ERGEBNISSE DER ENZYMISTOCHEMISCHEN UND AUTORADIOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNGEN                               |    |
| 2.2.1. Anzahl der Enzymdefektbezirke je cm <sup>2</sup> Schnittfläche                                         | 51 |
| 2.2.2. Größe und Zellzahl der Enzymdefektbezirke                                                              | 51 |
| 2.2.3. Markierungsindex in den Enzymdefektbezirken und im normalen Parenchym                                  | 52 |
| 2.3. ÜBERLEBENSZEITEN UND TODESURSACHEN DER VERSUCHSTIERE NACH DÄNA - APPLIKATION UND PARTIELLER HEPATEKTOMIE |    |
| 2.3.1. Todeszeitpunkt und Befunde nach 15-tägiger DÄNA-Behandlung                                             | 69 |
| 2.3.2. Todeszeitpunkt und Befunde nach 30-tägiger DÄNA-Behandlung                                             | 74 |
| <u>3. DISKUSSION</u>                                                                                          |    |
| 3.1. DISKUSSION DER AUTORADIOGRAPHISCHEN UND ENZYMISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN                               |    |
| 3.1.1. Vorteile einer mehrfachen Markierung mit <sup>3</sup> H-Thymidin                                       | 81 |
| 3.1.2. Zur Auswertung der Markierungsindices der Enzymdefektbezirke                                           | 83 |
| 3.1.3. Zur Streubreite der EDB-Markierungen                                                                   | 84 |
| 3.1.4. Diskussion des Kurvenverlaufs der EDB-Markierungen                                                     | 85 |
| 3.1.5. Wachstum der Enzymdefektbezirke                                                                        | 88 |

|                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1.6. Wachstumskinetik der Enzymdefekt-<br>bezirke                              | 91  |
| 3.2. DISKUSSION DER ÜBERLEBENSZEIT UND DER<br>TUMORENTWICKLUNG DER KONTROLLTIERE |     |
| 3.2.1. Überlebenszeit der Tiere                                                  | 95  |
| 3.2.2. Zur histologischen Auswertung der<br>Präparate                            | 97  |
| 3.3. SCHLUSSBEMERKUNG                                                            | 99  |
| <u>4. ZUSAMMENFASSUNG</u>                                                        | 101 |
| <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>                                                      | 106 |

## ABKÜRZUNGEN

|                        |                                                   |
|------------------------|---------------------------------------------------|
| ATPase                 | Adenosintriphosphatase                            |
| DÄNA                   | Diäthylnitrosamin                                 |
| DMNA                   | Dimethylnitrosamin                                |
| DNS                    | Desoxyribonukleinsäure                            |
| EDB                    | Enzymdefektbezirk                                 |
| G <sub>1</sub> -Phase  | Präsynthetische Ruhephase                         |
| G <sub>2</sub> -Phase  | Postsynthetische, prämitotische Ruhephase         |
| G-6-Pase               | Glucose-6-Phosphatase                             |
| RNS                    | Ribonukleinsäure                                  |
| t-RNS                  | Transfer - Ribonukleinsäure                       |
| S-Phase                | DNS - Synthesephase                               |
| t <sub>C</sub>         | Zellzykluszeit                                    |
| t <sub>S</sub>         | Dauer der DNS - Synthesephase                     |
| TdR- <sup>3</sup> H-MI | <sup>3</sup> H-Thymin - Markierungsindex          |
| n                      | Stichprobenumfang                                 |
| s                      | Standardabweichung der Stichprobe                 |
| s <sub>x̄</sub>        | Mittlerer Fehler des Mittelwerts einer Stichprobe |
| $\bar{x}$              | Mittelwert einer Stichprobe                       |

## 1. ALLGEMEINER TEIL

### 1.1. ZUR WIRKUNGSWEISE DES DIÄTHYLNITROSAMINS

#### 1.1.1. Eigenschaften des Diäthylnitrosamins

Die Erzeugung von Lebertumoren durch Gabe von Diäthylnitrosamin kann als Standardmodell der experimentellen Kanzerogenese betrachtet werden. Nach der Entdeckung der kanzerogenen Wirkung des Dimethylnitrosamins durch Magee und Barnes (1956) wurden zahlreiche andere Dialkylnitrosamine, Acylnitrosamine und Diazoalkane getestet und zum Teil selektive kanzerogene Wirkung an verschiedenen Organen zahlreicher Tierspezies festgestellt (Übersicht bei Druckrey et al. 1967).

Verschiedene Eigenschaften machen das Diäthylnitrosamin für Kanzerogenese - Versuche besonders geeignet. Es ist von allen Dialkylnitrosaminen am besten wasserlöslich, daher exakt im Trinkwasser dosierbar und nur kurze Zeit im Körper verfügbar. Nach 20 - 24 Stunden ist es völlig metabolisiert (Magee und Lee 1964). Im Gegensatz zu fettlöslichen Kanzerogenen, wie z.B. Azofarbstoffen und Fluorenen kumuliert das DÄNA nicht im Fettgewebe und ist daher in seiner Wirkung vom schwankenden Fettgehalt der Versuchstiere unabhängig.

Weitere Merkmale sind eine strenge Organspezifität (Schmähl et al. 1960), eine relativ geringe Toxizität (Heath 1962) bei hoher Kanzerogenität (Druckrey 1967) und eine exakte Dosis - Wirkungs - Beziehung. Bei den erzeugten Tumoren handelt es sich vorwiegend um hepa-

tozelluläre Karzinome (Thomas 1961); Gallengangskarzinome sind äußerst selten. Nierentumoren wurden bei kurzdauernder hochdosierter Applikation beobachtet (Meister und Rabes 1973).

### 1.1.2. Dosis - Wirkungs - Beziehung

Der Zeitablauf der Krebsentwicklung durch DÄNA erfolgt bei exakter Dosierung und einheitlichem Rattenstamm besonders regelmäßig (Druckrey und Schmähel 1962, Rajewsky et al. 1966). Bei gut verträglicher, nicht toxischer Tagesdosis ist dabei die Tumorausbeute größer als beim Dimethylnitrosamin oder Dimethylaminoazobenzol (Schmähel et al 1960). Mit zunehmender Anzahl der C - Atome eines Dialkylnitrosamins steigt die zur Krebsentstehung erforderliche Gesamtdosis an und beträgt für Dimethylnitrosamin, Diäthylnitrosamin und Diamylnitrosamin 500, 700, bzw. 2800 mg/kg (Druckrey et al. 1961). Entscheidend ist dabei nicht die Einzeldosis, sondern die Gesamtdosis ("irreversible summation").

Die Beziehung zwischen der Höhe der Tagesdosis  $d$  und der Zeit bis zum Auftreten von Tumoren, der Induktionszeit  $t$  kann durch die Formel  $d \times t^n = \text{const.}$  ausgedrückt werden. Der Zeitfaktor  $n$  ist eine für jedes Kanzerogen charakteristische Größe und beträgt für das DÄNA  $n = 2,3$  (Rajewsky et al. 1966).

Bei entsprechend hoher Dosierung können auch durch eine einmalige Verabreichung von DÄNA Lebertumoren erzeugt werden; daneben entstehen auch Nierentumoren (Craddock 1969). Diese Tatsache wird durch ein spezielles aktivierendes Enzymsystem erklärt, das in der Niere in geringerer Menge als in der Leber vorliegt und erst bei hohen DÄNA - Dosen eine genügende Konzentration von aktivier-

tem Kanzerogen bereitstellt. Dieser Mechanismus könnte noch dadurch verstärkt werden, daß eine toxische Kanzerogendosis das aktivierende Enzym in der Leber schädigt und so eine größere Menge DÄNA zur Kanzerisierung anderer Organe zur Verfügung steht (Den Engelse und Emmelot 1971).

Auch andere Kanzerogene können nach einer hohen Einzeldosis Tumoren erzeugen; so verursacht eine Injektion von N-Methyl-N-Nitrosos-harnstoff, eine instabile Substanz, die sich ohne Enzymaktivierung rasch zu Diazomethan abbaut, in vielen Organen Karzinome, jedoch nicht in der Leber.

Die in den hier durchgeführten Versuchen gewählte Dosierung von 5 mg DÄNA/kg/Tag erzeugt nach 140 - 160 Tagen hepatozelluläre Karzinome (Schmährl et al. 1960, Rabes et al. 1972). Diese Dosis entspricht zwei Prozent der akuten LD<sub>50</sub> (Rajewsky 1967) und läßt bei nahezu hundertprozentiger Tumorausbeute (Grundmann und Sieburg 1962) die toxische Wirkung in den Hintergrund treten.

#### 1.1.3. DÄNA - Metabolismus

Craddock und Magee (1963, 1966) wiesen anhand des dem DÄNA analogen Dimethylnitrosamin (DMNA) nach, daß die kanzerogene Wirkung erst nach Umwandlung in ein aktiviertes Produkt eintritt. Das hierfür verantwortliche Enzym soll nach Emmelot und Benedetti (1960) und Borek (1963) eine mikrosomale N-Dealkylase sein, die zur Gruppe der mischfunktionellen Oxidasen gehört (Mason et al. 1965, Knecht 1966). Nach Knecht (1966) kommt das Enzym in höchster Konzentration in der Leber vor und mit abfallender Aktivität auch

in Niere, Lunge und Muskel. Die Alkylierung der Purinbasen, speziell des Guanins der Nukleinsäuren wird nach Craddock und Magee (1966) möglicherweise durch Diazoalkan oder ein Carbonium - Ion, das aus dem Umwandlungsprodukt hervorgeht, herbeigeführt. Der Grad der Alkylierung ist an den Nukleinsäuren wesentlich höher als an den Proteinen.

Magee (1956) und Druckrey und Schmähel (1962) halten die ebenfalls in der Leber vorkommenden alpha-Hydroxylasen für das DÄNA - aktivierende Enzymsystem. Hierbei soll mit Hilfe von Sauerstoff und NADP Formaldehyd abgespalten werden. Die entstehende Verbindung könnte unter Wasserabspaltung in Diazomethan übergehen, das zelluläre Makromoleküle alkyliert. Eine ebenfalls als Nitrosamin aufzufassende Verbindung, das Methylnitroso-N'-Guanidin (MNNG) spaltet spontan Diazomethan ab. Vermutlich über die Bildung von Methyl diazonium - Kation entwickelt es eine alkylierende und mutagene Wirkung, die heute vorzugsweise bei Bakterien zur Erzeugung von Mutationen verwendet wird.

Die Tatsache, daß DÄNA nicht mutagen auf Bakterien wirkt, spricht für die Notwendigkeit einer Enzymaktivierung, da bei ihnen keine Hydroxylasen vorhanden sind. Auch die hohe Organspezifität spricht für eine organgebundene Giftung des DÄNA; schließlich werden die Tumoren in der Leber erzeugt, während die höchste Konzentration im Magen - Darmtrakt vorhanden ist.

Transplazentar wirken die Nitrosamine erst nach dem 23. Schwangerschaftstag bei Ratten kanzerogen, da vor diesem Zeitpunkt die fötale Leber noch zu unreif ist, um das aktivierende Enzym zu bilden (Druckrey et al. 1967).

Gibt man bei der erwachsenen Ratte gleichzeitig mit DMNA Dimethyl-

formamid, so wird die Stoffwechselrate des Kanzerogens herabgesetzt und es entstehen auch in der Leber keine Tumoren (Heath 1962).

#### 1.1.4. Alkylierung der Nukleinsäuren

Die Irreversibilität vieler durch DÄNA hervorgerufenen präneoplastischen Veränderungen spricht für eine entscheidende Rolle der Nukleinsäuren, speziell der DNS im Sinne von somatischen Mutationen.

Untersucht man die nach DMNA - oder DÄNA - Behandlung in den Leberzellen entstandenen Nukleinsäuren, so findet man als Hauptreaktionsprodukt die Base 7-Alkylguanin; in weit geringerer Menge entstehen O<sup>6</sup>-Alkylguanin, 3-Alkyladenin, 1-Alkyladenin und 3-Alkylguanin. Aus diesem Grunde vermuteten Lawley und Brookes (1961), daß die Bildung von 7-Alkylguanin ein wichtiger Schritt in der Kanzerogenese durch alkylierende Stoffe sei. Untersuchungen von Craddock (1973) zeigten jedoch, daß bereits nach zwei Tagen das 7-Methylguanin aus der DNS und RNS der intakten Leber verschwunden ist, da die falschen Basen entweder durch sogenannte "Repair - Enzyme" exzidiert werden oder durch Schwächung der Glykosidbindung mit der Desoxyribose und der Ribose und Bruch des DNS - Einzelstranges verlorengehen.

Loveless (1969) wies als erster auf eine mögliche Wirkung bestimmter alkylierender Moleküle an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins und ihre Bedeutung für Mutagenese und Kanzerogenese hin. Versuche von Gerchmann und Ludlum (1973) konnten diese Vermutung bestätigen. Eine Alkylierung der O<sup>6</sup>-Position fixiert das Guanin nämlich in einer

unnatürlichen tautomeren Form; diese Struktur würde es ermöglichen, daß bei der DNS - Verdoppelung eine falsche Basenpaarung entsteht. Vergleicht man eine Reihe verschieden wirksamer alkylie-render Kanzerogene, so korreliert die Bildung von O<sup>6</sup>-Alkylguanin mit der Kanzerogenität viel besser als die Fähigkeit, 7-Alkylguanin oder andere Produkte zu bilden (Lawley und Thatcher 1970, Shah 1973). Sowohl DMNA als auch das nicht kanzerogene Methyl - Methansulfonat bilden in der Leber 7-Methylguanin, während nur DMNA O<sup>6</sup>-Methylguanin erzeugt. Möglicherweise behindert das 7-Methylguanin die DNS - Verdoppelung so lange, bis der Schaden am genetischen Material repariert ist.

Käme es nun aufgrund von Alkylierung des Basenanteils der DNS zu einer falschen Basenpaarung, die das Strukturgen eines Enzymproteins betrifft, so könnte das betreffende Enzym nicht mehr produziert werden. Dadurch würden Stoffwechselwege blockiert, Stoffwechselprodukte häuften sich an oder würden auf anderen Wegen abgebaut. Auch die Lösung der Zucker - Phosphat - Bindung mit Bildung von DNS - Fragmenten führt zu einer grundsätzlichen Änderung der genetischen Information.

Ein solcher Ausfall des Struktur- und auch des Regulatorgens könnte zu der kompensatorischen Steigerung der RNS - Produktion führen, die in autoradiographischen Untersuchungen von Schauer und Kunze (1967) nachgewiesen wurde.

Die Bedeutung der Enzyme des Nukleinsäurestoffwechsels ist noch unklar. Godwin et al. (1967) diskutieren eine Aktivitätssteigerung der RNS - Polymerase, welche für den Anstieg der nukleolären RNS - Synthese in frühen Stadien der Dimethylaminoazobenzol - Kanzero-

genese verantwortlich sein soll.

Eine Mutation, die die DNS - Polymerase betrifft, könnte nach Meinung von Loeb et al. (1974) einen Abfall in der Genauigkeit der DNS - Replikation verursachen.

#### 1.1.5. Alkylierung von Cytoplasmabestandteilen

Neben den Nukleinsäuren greift die Alkylierung auch die Strukturen des Ergastoplasmas an und führt schon bei kleinen Dosen und kurzdauernder Anwendung zu einer in vivo und in vitro nachweisbaren Hemmung der Proteinsynthese (Magee 1958, Brouwers und Emmelot 1960). Der Wirkungsort der Nitrosamine liegt somit an der gleichen Stelle wie der von verschiedenen Derivaten des Dimethylaminoazobenzols, die nach Befunden von Miller und Miller (1953) und Fiala und Fiala (1959b) an den cytoplasmatischen Proteinen des Ergastoplasmas gebunden werden.

Für Aminoazoverbindungen (Sorof et al. 1951), für 2-Acetylaminofluoren - Derivate (Sorof et al. 1960) und für einige Kohlenwasserstoffe (Abell und Heidelberger 1962) ist eine Beziehung zwischen kanzerogener Potenz und Bindungsfähigkeit an die löslichen Plasmaproteine nachgewiesen worden.

Während der Kanzerisierung der Mäuseepidermis mit Methylcholanthren (Oehlert et al. 1961, Oehlert und Coté 1962) verarmt das Cytoplasma trotz gesteigerter nukleärer RNS - Synthese an Nukleoproteiden. Cytophotometrische Untersuchungen während der DÄNA - induzierten Kanzerogenese (Hobrik und Grundmann 1962) zeigen, daß mit der Verarmung des Cytoplasmas an Nukleoproteiden ein Abbau der Strukturproteine des Ergastoplasmas einhergeht.

Parallel mit der Verminderung der Strukturproteine im Cytoplasma wurde ein rascher Anstieg der anaeroben Glykolyse gefunden (Fiala und Fiala 1959a). Damit könnte der mit der malignen Transformation einhergehende plötzliche Glykogenverlust der Zellen erklärt werden.

Es wurde die Hypothese entwickelt, daß mit dem Abbau der cytoplasmatischen Strukturen, insbesondere des Ergastoplasmas, das Cytoplasma entdifferenziert und seine physiologische Hemmwirkung auf die DNS - Synthese im Kern beseitigt (Büchner 1961).

Als weiterer Angriffspunkt von Kanzerogenen wird bei der Kohlenwasserstoff - Kanzerogenese eine entscheidende Rolle der Lysosomen diskutiert. Durch eine Senkung der Stabilität lysosomaler Membranen und Freigabe von Enzymen mit starker cytotoxischer Wirkung in das Cytoplasma könnte vielleicht der Kontrollmechanismus der Zellteilung gestört werden (Allison und Malluci 1964). Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß ein solcher Mechanismus auf die DÄNA - Kanzerogenese zutrifft.

#### 1.1.6. Histologische Veränderungen der Leber

Auf dem Weg einer Somazelle zur Tumorzelle kann für viele kanzerogene Stoffe eine gemeinsame Endstrecke angenommen werden. Die im Lichtmikroskop erkennbaren Veränderungen laufen relativ gleichförmig ab und spiegeln die mit dieser Methode erfaßbaren Reaktionen des zellulären Stoffwechsels auf die Schädigung wider. In Untersuchungen von Grundmann und Sieburg (1962) wurden nach Verfütterung von DÄNA vier charakteristische Phasen gefunden.

Die erste Phase steht ganz im Zeichen toxischer Reaktionen und kompensatorischer Zelleistungen. Im Cytoplasma bilden sich unter starker Schwellung der Zellen verschieden große Vakuolen, die zu einer Reduktion und Verdrängung der basophilen Schollen führen. Diese grobblasige Zellreaktion gilt als Zeichen einer starken Wasseraufnahme in den Zelleib, die mit einer energetischen Insuffizienz zusammenhängen soll. Da die Wasseransammlung die perinukleären Regionen bevorzugt, werden die basophilen Schollen an die Innenwand der Zellmembran gedrängt, so daß der Kern in einem optisch leeren Raum zu liegen scheint. In den Läppchenzentren ist eine relative und absolute Verminderung der basophilen Schollen zu beobachten, während sie in der Peripherie kompensatorisch vermehrt sind. Diese Alteration der cytoplasmatischen Basophilie soll im Zusammenhang stehen mit elektronenoptischen Befunden von Porter und Bruni (1959), die nach Gabe von Buttergelb eine Abhebung der FNS - Granula von den Ergastoplasmalamellen beobachteten, verbunden mit einer Verminderung und Verquellung.

Zugleich sind die Kerne dieser Zellen deutlich vergrößert und zeigen eine unterschiedliche Zunahme der Farbintensität als Ausdruck einer Funktionssteigerung der Kernelemente.

Neben diesem "pathologischen" Kernödem besteht auch eine Vermehrung der höherploidien Kerne.

Vor allem in der Läppchenperipherie wird in einzelnen Epithelzellen das Cytoplasma eosinophil verdichtet, der Kern schrumpft und wird als sogenanntes "Councilman - Körperchen" aus dem Leberzellbalken ausgestoßen.

Die einzige Mesenchymreaktion ist eine Vermehrung und Siderose der Sternzellen.

In der zweiten Phase verlagert sich der Schwerpunkt der Veränderungen von den Periportalfeldern auf die Läppchenzentren. Das Bild der grobblasigen Schwellung geht in eine feinblasige Zellreaktion über und kann als Ausdruck einer gelungenen Kompensation des primären Wassereinstroms verstanden werden, jedoch sind die Zellen weiterhin stark aufgetrieben. Durch Eintritt von Proteinen in die Zelle und ihre Kondensation kommt es zur Bildung von hyalinen oder lamellären Eiweißkörpern. Die Zellen sind arm an Glykogen und die basophilen Schollen manchmal völlig geschwunden. Auch die Kerne sind weiterhin stark vergrößert, verstärkt mit Hämatoxylin anfärbbar und enthalten vermehrt vergrößerte Nukleolen. Im Läppchenzentrum nimmt die Zahl höherploidierender Kerne zu, während in der Peripherie die Kleinkerne vorherrschen. Eine Bindegewebsvermehrung oder Gallengangsproliferation liegt auch jetzt nicht vor.

Inmitten der großkernigen zentralen Bezirke tritt in der dritten Phase mit dem Erscheinen eines neuen Zelltyps die maligne Transformation ein (Daoust 1963). Es handelt sich um kleine Zellen, deren kleine Kerne relativ hell anfärbbar sind und einen vergleichsweise großen Nukleolus enthalten. Dieser Umschlag wird von Grundmann und Sieburg als plötzliche Ploidiereduktion aufgefaßt, die durch amitotische Kern- und Zelldurchschnürungen vonstatten gehe, da Mitosen in diesen Bereichen selten sind.

Am Cytoplasma fallen in der HE - Färbung eine besondere Dichte und verstärkte Eosinophilie auf, bei Färbung mit Kresylviolett oder Gallocyanchromalaun sind diese Zellnester stark basophil. Die Vakuolisierung ist geschwunden und das Cytoplasma frei von Glykogen.

Histologisch ist eine gewisse Unruhe von Zell- und Kernbild zu beobachten, die Zellen sind aber noch wie normales Lebergewebe in Balken angeordnet. In den größeren basophilen Zellnestern steigt die Mitoserate rasch auf 8 - 16  $\text{‰}$  an.

Makroskopisch sind diese Bereiche bereits als kleine weiße Stippchen zu erkennen, die die ganze Leber durchsetzen (Büchner 1961). Nach Grundmann und Sieburg (1962), Oehlert und Hartje (1963) und Friedrich - Freksa et al. (1969) ist dies als Mikrokarzinom - Stadium anzusehen.

In der vierten Phase beherrscht ein Nebeneinander der basophilen, jetzt polymorphkernigen Nester und der blasig gequollenen, gering basophilen Zellverbände das histologische Bild. Die basophilen Nester fließen zusammen und erreichen unter ständiger Vergrößerung eine Mitoserate von 40  $\text{‰}$ .

Die Läppchenstruktur ist weitgehend aufgehoben und durch solide Epithelverbände ersetzt. Die Kern- und Zellpolymorphie verstärkt sich und es treten vermehrt Einzelzellnekrosen auf.

Eine geringe Mesenchymreaktion führt nun zu einer Verbreiterung der Portalfelder und Proliferation der Gallengänge. Im nicht kanzerösen Parenchym steigt die Mitoserate auf 4 - 5  $\text{‰}$ , vermutlich als Ersatz der zugrundegegangenen Zellen.

Makroskopisch bietet sich dann das Bild von grobknotigen Leberkarzinomen mit invasivem Wachstum und Metastasierung.

Beobachtet man die Karzinomentstehung durch höhere DÄNA - Dosen, so können prinzipiell die gleichen Veränderungen gefunden werden. Daneben kommt es zu Parenchymnekrosen sowie zu einer immer stärkeren mesenchymalen Reaktion in den Leberläppchen und den Portalfel-

dern. Später treten auch zirrhotische Veränderungen auf.

Bei sehr hohen Tagesdosen von DÄNA entwickelt sich zuerst nach etwa 6 Wochen das volle Bild einer Leberzirrhose, auf deren Boden nach weiterer DÄNA - Gabe hepatozelluläre Karzinome entstehen.

Während hier gezeigt wurde, daß die Krebsentstehung unabhängig von mesenchymalen Reaktionen abläuft, betonen Stewart und Snell (1957) für verschiedene untersuchte Kanzerogene eine einheitliche Mesenchymbeteiligung. Da bei Versuchen mit 4-p-Dimethylaminoazobenzol, Azetaminofluoren oder Aminoazotoluol dem Karzinom stets eine periportale Fibrose mit Vermehrung der kleinen Gallengänge und oft sogar ein zirrhotischer Umbau vorausgehen, halten verschiedene Autoren (Price et al. 1952, Farber 1956) die Cholangiofibrose bzw. die Leberzirrhose für obligate Vorstufen des Leberkarzinoms.

Grundmann und Sieburg (1962) dagegen betonen die verschiedenen Wege dieser Leberschädigungen, nämlich die Zirrhose als Reaktion auf die Epithelnekrosen und das Karzinom als Folge einer für die Zelle subletalen Störung mit anschließender Umstellung des Stoffwechsels. Bei der Anwendung von Urethan, Dimethylnitrosamin und Dimethylbenzanthrazen fanden Chernozemski und Warwick (1970a) sogar einen umgekehrten Zusammenhang zwischen zelltötenden Eigenschaften und kanzerogener Potenz.

Als weiteren Beweis für die Unabhängigkeit der Krebsentstehung von toxischen Wirkungen zeigten Schauer und Krzenciessa (unveröffentlicht), daß die Serumspiegel der Leberenzyme während der DÄNA - Kanzerogenese nicht ansteigen.

#### 1.1.7. Bedeutung der hyperplastischen Knötchen

Die ersten makroskopisch sichtbaren Veränderungen während der Kanzerogenese sind die sogenannten hyperplastischen Knötchen. Sie sind von gelblicher bis bräunlicher Farbe, leicht über die Leberoberfläche erhaben und von etwas brüchiger Konsistenz. Im Lichtmikroskop kann man stets eine Kompression des umgebenden Gewebes erkennen; die Knötchen selbst sind in ein feines Fasernetz eingehüllt und zeigen keine Tendenz zur Invasion. Die Architektur ist weder azinär noch lobär und es ist eine große Anzahl von Gallengängen vorhanden.

Im Gegensatz zum Karzinom ist das Verhältnis Kern zu Cytoplasma kleiner als normal; letzteres zeigt eine vakuolige Struktur und auch im Hunger Glykogenspeicherung. Die Kerne sind abgesehen von vereinzelt Doppelkernen, prominenten Nukleoli und verstärkter Basophilie normal (Farber 1973).

Noduläre Hyperplasie wurde beschrieben während der Hepatokarzinogenese mit p-Dimethylaminoazobenzol und Abkömmlingen (Daoust 1963, Opie 1944), 2-Acetylaminofluoren (Farber 1956), Nitrosaminen (Magee und Barnes 1956, 1967, Schauer und Kunze 1968), Nitrosomorpholin (Bannasch 1968, Büchner 1961), Äthionin (Farber 1956) und anderen Kanzerogenen.

Während die Knötchen normalerweise eine Größe von wenigen Millimetern nicht überschreiten, kann man mit intermittierender oder ansteigender Fütterung von Äthionin oder 2-Acetylaminofluoren solche von 2 - 2,5 cm Durchmesser erzeugen (Epstein et al. 1967). In Kultur gezüchtet, bewahren die Hyperplastic Liver Nodule (HLN)-Zellen charakteristische Züge von Leberparenchymzellen, unter-

scheiden sich aber doch deutlich von normaler Leber einerseits und von malignem Gewebe andererseits (Slifkin et al. 1972).

Nach Farber (1973) entstehen die hyperplastischen Knötchen durch Selektion und Proliferation einer eng begrenzten und uniformen Population von Zellen, die aufgrund genetischer Veränderungen gegen den inhibitorischen und toxischen Effekt des Kanzerogens immun geworden sind ("Escape - Phänomen") (Vasiliev und Guelstein 1963).

Ihre Rolle als wichtige Vorläufer von hepatozellulären Karzinomen kann aufgrund folgender Beobachtungen angenommen werden:

1. Jedes Hepatokarzinogen induziert hyperplastische Knötchen.
2. Leberwirksame Stoffe ohne kanzerogene Wirkung induzieren keine hyperplastischen Knötchen, auch wenn sie viele andere funktionelle und strukturelle Veränderungen hervorrufen.
3. Cytologische und histologische Veränderungen, wie sie in hepatozellulären Karzinomen auftreten, findet man zwar in den hyperplastischen Knötchen, jedoch nicht im umliegenden Parenchym.

Nach Absetzen des Kanzerogens bestehen die Knötchen noch für lange Zeit, und in ihrem Bereich entwickeln sich die oben beschriebenen hyperbasophilen Bezirke.

Kitigawa und Pitot (1975) nehmen aufgrund von enzymhistochemischen und histologischen Untersuchungen an, daß hyperplastische Knötchen die Fähigkeit haben, entweder durch einen Reifungs- und Differenzierungsprozeß zu einem gutartigeren Zustand zurückzukehren oder durch Entdifferenzierung unreifer zu werden und maligne zu entarten.

### 1.1.8. Enzymhistochemische Veränderungen

Bedeutung der Enzymhistochemie: Auf der Suche nach irreversiblen Veränderungen vor dem Auftreten von Karzinomen bietet sich als sehr empfindlicher Parameter für Störungen des Funktionsstoffwechsels in der Latenzperiode der Schwund histochemischer Enzymaktivitäten an. Hierbei ist die Untersuchung der Glucose-6-Phosphatase und der Adenosintriphosphatase besonders geeignet, da sie unter Erhaltung der Gewebsintegrität durch die Methode von Wachstein und Meisel (1956) nachgewiesen werden können. Untersuchungen von Gössner und Friedrich - Freksa (1964) ergaben, daß lange vor dem Auftreten von Karzinomen bei Ratten, die mit DÄNA behandelt wurden, inselartige Zellbereiche in der Leber auftreten, die frei von Glucose-6-Phosphatase (G-6-Pase) sind.

Charakteristik der Enzyme: Als Schlüsselenzym im Kohlenhydratstoffwechsel nimmt die G-6-Pase über die Freisetzung von Glykogen und über die Umkehr der Glykolyse an der Regulation des Blutzuckers teil. Die histochemische Aktivität dieses Enzyms ist auf die Parenchymzellen beschränkt und an die glatten und rauhen Elemente des Endoplasmatischen Retikulums gebunden. Im nicht gegengefärbten Präparat bleibt der Zellkern optisch leer. Innerhalb des Leberläppchens nimmt die Aktivität vom Portalfeld zum Läppchenzentrum hin ab (Wachstein und Meisel 1957, Börner und Gössner 1968). Nach 18-stündigem Hungern nimmt die histochemische Aktivität der G-6-Pase in allen Teilen des Läppchens stark zu (Linke 1962). Die Adenosintriphosphatase (ATPase) ist an der Hydrolyse energiereicher Phosphate beteiligt und spielt eine Rolle im Energiestoffwechsel, andererseits bei zahlreichen Synthesen, insbeson-

dere im Protein- und Nukleinsäurestoffwechsel. Das Enzym ist in der Leberparenchymzelle vor allem an der Zellmembran, im Cytoplasma, darin besonders an der peribiliären Granula und an den Nukleolen nachweisbar. Die stärkste histochemische Aktivität ist jedoch an die Gallenkapillaren gebunden. Das Verteilungsmuster innerhalb eines Leberläppchens gleicht etwa dem der G-6-Pase (Wachstein und Meisel 1957), Wachstein 1959, Schauer 1966, Börner und Gössner 1968).

Art der Veränderungen durch DÄNA: Bei der Verabreichung von 8mg DÄNA/kg/Tag oder dem kaum kanzerogenen, aber stark toxischen Thioazetamid in gleicher Dosierung erkennt man schon nach wenigen Tagen einen Ausfall der Enzymreaktionen um die Zentralvenen. Bei weiterer Fütterung konfluieren diese Bereiche und ergeben ein den Stauungsstraßen ähnliches Bild; sie werden deshalb kurz "Straßen" genannt (Friedrich - Freksa et al. 1969). Diese Straßen sind nach Absetzen des jeweiligen Stoffes reversibel und stehen also nicht notwendig mit der Kanzerogenese im Zusammenhang. Entsprechende Veränderungen sind bereits durch Rappaport (1963) bei der Einwirkung von Tetrachlorkohlenstoff und anderen Lebergiften beschrieben worden. Die Reversibilität wurde von Eder et al. (1965) erkannt. Nach der Rückbildung der Straßen treten bei der DÄNA - Behandlung nach einer Latenzzeit von einigen Wochen Bezirke mit völligem Verlust der histochemischen Aktivität von G-6-Pase und ATPase auf, die nicht reversibel sind. Sie sind zuerst rund, später landkartenförmig begrenzt und scharf gegen die Umgebung abgesetzt. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Straßen werden diese Veränderungen "Inseln" genannt (Gössner und Friedrich - Freksa 1964, Schauer

1966, Schauer und Kunze 1968, Friedrich - Freksa et al. 1969a und b). Bei der ATPase - Reaktion betrifft der Enzymausfall vorwiegend die Gallengänge, die Parenchymzellen zeigen einen wechselnd starken Ausfall. In dem der Zentralvene nahen Teil der Inseln ist das Enzymdefizit außerdem stärker.

Im Gegensatz zu den Karzinomen ist bei kontinuierlicher Anwendung die Beziehung zwischen der Kanzerogenkonzentration und der Zeit bis zum ersten Auftreten von Inseln linear; einzelne Kanzerogendosen wirken also nahezu additiv (Friedrich - Freksa et al. 1969). Elektronenmikroskopisch erkennt man in den G-6-Pase - freien Inseln eine starke Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (Bannasch 1968). Diese Vermehrung von glattem ER, die als Folge von vielen chronischen Leberschädigungen beobachtet werden kann, wird von Hutterer et al. (1969) als "hypoaktives hypertrophisches glattes endoplasmatisches Retikulum" bezeichnet.

Wachstumskinetik der Inseln: Setzt man die DÄNA - Applikation nach verschieden langer Fütterungsdauer ab und beobachtet das Wachstum der Inseln nach verschieden langen Zeiträumen, so wird von mehreren Autoren über ein etwa 10 - 15 Wochen dauerndes langsames Wachstum berichtet, das dann plötzlich in eine rasche Proliferation übergeht (Rabes und Zettler 1974, Friedrich - Freksa et al. 1969b). Dies stimmt gut überein mit der Beobachtung, daß die Mitoserate in den Inseln zunächst kaum höher ist als im umgebenden Parenchym und dann plötzlich ansteigt. Gleichzeitig mit diesem Anstieg der endogenen Proliferation verlieren die Inselzellen die Fähigkeit, auf einen Wachstumsreiz mit einem Proliferationsanstieg zu antworten (Rabes et al. 1970).

Während sich bei Schauer und Kunze (1968) eine gute Übereinstimmung in Form und Lokalisation zwischen Inseln ohne G-6-Pase und ATPase fand, zeigten bei Scherer et al. (1972) und Scherer und Emmelot (1975) nur 10 - 20% der ATPase - defizienten Inseln auch einen Ausfall der G-6-Pase. Die G-6-Pase - Ausfallsbezirke waren jedoch zu 90% frei von ATPase.

Schieferstein et al. (1974) fanden einen Zusammenhang zwischen der Koinzidenz beider Enzymausfälle und dem Wachstumsverhalten der Inseln. Während bei kontinuierlicher Gabe von 5mg DÄNA/kg/Tag der prozentuale Anteil des Inselgewebes am Gesamtparenchym und die Inselflächen mit zunehmender Gesamtdosis logarithmisch anstiegen, zeigten die Inseln der kleinsten Größenklasse eine Koinzidenz von 20%, die größeren dagegen von 100%.

Entstehung der Inseln: Da die Enzymausfälle in den Inseln irreversibel sind, werden sie von Friedrich - Freksa et al. (1969) als somatische Mutationen betrachtet. Aus der Tatsache, daß die Zahl der entstehenden Inseln proportional zur verabreichten DÄNA - Dosis ist, folgern Scherer et al. (1972), daß die Mutation durch einen sogenannten "one - hit - process" zustande kommt, bei dem durch die Alkylierung das Strukturgen des jeweiligen Enzyms blockiert wird.

Clonale Entstehung der Inseln: Eine wichtige Frage bei der Beurteilung des Wachstumsverhaltens ist die, ob die Inseln auf clonalem Wege durch Proliferation der alterierten Einzelzellen entstehen oder ob ein ganzer Zellbereich umdeterminiert wird. Bei enzym-histochemischen Untersuchungen ist es nämlich nicht möglich, die

Veränderungen bis zur Einzelzelle zurückzuverfolgen.

Autoradiographische Untersuchungen von Scherer und Hoffmann (1971) unterstützen die Auffassung einer clonalen Entstehung. Die Silberkorndichte über den Zellen von Enzymausfallsbezirken war sechs Wochen nach DÄNA - Verabreichung mit gleichzeitiger  $^3\text{H}$ -Thymidininjektion gegenüber der Umgebung deutlich "verdünnt", ein Zeichen, daß sich die Inselzellen während dieser Zeit mehrfach geteilt haben mußten. Dabei muß natürlich vorausgesetzt werden, daß die Thymidin - Inkorporation in diese Zellen nicht von vorneherein verringert ist.

Auch das übereinstimmend von mehreren Autoren beschriebene exponentielle Wachstum legt eine clonale Genese der Inseln nahe; ein appositionelles Wachstum hätte dagegen eine lineare Größenzunahme zur Folge. Nimmt man einen Zusammenhang zwischen Enzymausfallsbezirken und Krebsentwicklung an, so deutet die Homogenität der Zellen eines Tumors in einer Reihe morphologischer, ultrastruktureller und biochemischer Charakteristika auf die Entstehung aus einer Einzelzelle hin.

Es fehlt jedoch nicht an Beobachtungen, die gegen eine clonale Genese der Inseln sprechen: Friedrich - Freksa et al. (1969) fanden in G-6-Pase - Ausfallsbezirken nur sehr wenige Mitosen, was für eine Ausbreitung der Inseln durch Umwandlung von weiterem normalem Gewebe in G-6-Pase - freie Zellen sprechen würde.

Friedrich - Freksa erklärt die Anhäufung von Inselzellen an der Zentralvene durch eine Zellmigration in zentrolobulärer Richtung. Während normalerweise die Zellen an der Zentralvene abgestoßen werden, könnten bei den Inselzellen verschiedene Mutationen so

zusammenwirken, daß die Zellteilungsrate die Abstoßungsrate übersteigt und die mutierten Zellen sich an der Zentralvene anhäufen.

Zusammenhang zwischen Enzymausfallsbezirken und Karzinomentstehung: Wahrscheinlich besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen Inseln und Karzinomen, denn nur kanzerogene Stoffe können auch irreversible Enzymausfallsbezirke erzeugen. Während Sydow und Fey (1969) keinen räumlichen und zeitlichen Zusammenhang zwischen histologischen, präneoplastischen Veränderungen und G-6-Pase - defekten Bezirken bzw. Glykogengehalt finden konnten, beobachteten Scherer und Emmelot (1975) eine klare Beziehung zwischen kleinen Tumoren und Resten von Inselgewebe. Untersucht man experimentell erzeugte Karzinome, so findet man in den einzelnen Tumoren verschiedene Kombinationen von Enzymdefekten (Pitot 1966). Auch Friedrich - Freksa (1969) fand nach zeitlich begrenzter Verabfolgung von DÄNA histochemisch sehr heterogene Karzinome, bezogen auf mikrosomales Antigen, G-6-Pase, Glykogen, ATPase, saure und alkalische Phosphatase. In den einzelnen Karzinomen dagegen war das Enzymmuster einheitlich. Dies würde den Schluß nahelegen, daß die Enzymausfälle nur zufällige Begleiterscheinungen der Kanzerogenese sind. Auch der gleichzeitige Verlust von G-6-Pase und ATPase muß weder eine hinreichende noch notwendige Voraussetzung für die Umwandlung einer Normalzelle in eine Tumorzelle sein, obwohl Schieferstein et al. (1974) gerade für dieses Enzymmuster eine erhöhte Proliferationsgeschwindigkeit der Inseln nachwies. Die Tumoren entstehen jedoch oft nicht aus diesen schnell proliferierenden Inseln mit einer Koinzidenz von 100%; die von Friedrich - Freksa (1969b) gefundene Übereinstimmung von G-6-Pase und ATPase in den Tumoren

liegt wesentlich niedriger.

Denkbar wäre jedoch, daß häufig vorkommende Enzymdefekte am Ausfall der Wachstumsregulation beim Karzinom beteiligt sein könnten. Nach Friedrich - Freksa kann die Zelle einzelne Defekte und Störungen noch ausgleichen, solange das Prinzip der mehrfachen Sicherung erfüllt ist. Übersteigt jedoch die Anzahl der Schädigungen diese Fähigkeit, so ist das Wachstum nicht mehr regulierbar und es kommt zum Karzinom.

Scherer und Emmelot (1975) sehen den kausalen Zusammenhang zwischen Insein und Karzinom darin, daß Inselzellen, die durch eine subkarzinogene Dosis aufgrund eines "one - hit - process" entstanden sind, als Angriffspunkt für weitere kanzerogene Wirkung dienen, offensichtlich indem sie weitere Schäden erleiden, die zum Karzinom führen.

Dieser "Gedächtniseffekt" einer subkarzinogenen Dosis scheint auf der Induktion und dem Bestehenbleiben eines erheblich veränderten Zelltyps zu beruhen. Zu erwähnen wäre noch der positive Effekt der Zeit ("time factor") für die Karzinomentstehung aus veränderten Zellen (Druckrey 1967).

#### 1.1.9. Glykogenstoffwechsel

Während der DÄNA - Kanzerogenese erfährt der Glykogengehalt der Zelle charakteristische Veränderungen, die im Zusammenhang sowohl mit histologischen als auch enzymhistochemischen Reaktionen zu sehen sind.

Gleichzeitig mit der von Grundmann und Sieburg (1962) beschriebenen feinblasigen Schwellung in den zentralen und intermediären

Läppchenbereichen verarmen die Zellen an Glykogen. In diesem Stadium sind jedoch noch alle Parenchymzellen in der Lage, Glykogen zu synthetisieren und im Hungerzustand völlig abzubauen. Im weiteren Verlauf, mit dem Auftreten von Glucose-6-Phosphatase - freien Inseln, findet sich in der Regel vermehrt Glykogen in den betroffenen Zellen (Sydow und Fey 1969). Im Hungerzustand oder durch Glucagongabe kann dieses Glykogen nicht mehr mobilisiert werden (Friedrich - Freksa et al. 1969). Offenbar verliert die Leberzelle mit dem Einsetzen des Enzymschwundes die Fähigkeit, das Glykogen in normaler Weise abzubauen. Da die Glucose-6-Phosphatase der letzte Schritt bei der Mobilisierung des Glykogens ist, bevor Glucose in die Blutbahn abgegeben wird, ist es verständlich, daß sich infolge des G-6-Pase - Verlustes Glykogen in den Zellen anhäuft, das auch im Hunger nicht mehr abgegeben wird (Papadopoulos 1967). Scherer et al. (1972) fanden jedoch in einem Teil der glykogenspeichernden Bezirke eine weitgehend normale G-6-Pase. Auch Bannasch (1967) beschrieb Glykogenspeicherung in Nitrosomorpholin - induzierten hyperplastischen Knötchen und vermutete, daß der Defekt im Glykogenabbau und nicht in der Synthese liege. Epstein (1968) fand in 2-Acetylaminofluoren - induzierten Knötchen nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Veränderungen im Glykogengehalt. Dieses Glykogen zeigte ein verändertes, instabiles Absorptionsspektrum, das auf covalent an das Glykogen gebundenes 2-Acetylaminofluoren zurückzuführen sein soll.

In diesem Stadium erhöhten Glykogengehaltes bestehen erhebliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Ratten bei kontinuierlicher DÄNA - Fütterung. Nach der Verabfolgung einer Gesamt-

dosis von 75 mg DÄNA treten bei den männlichen Tieren noch keine Veränderungen im Glykogengehalt auf, während er bei den weiblichen Tieren auf das 8-fache des Normalwertes erhöht ist.

Nach 120 mg DÄNA ist bei den männlichen Ratten der Glykogengehalt um 50% erhöht, bei den weiblichen dagegen auf die Hälfte abgesunken und beträgt somit noch das 4-fache der Norm.

In glykogenspeichernden Hepatomen jedoch ist der Glykogengehalt bei beiden Geschlechtern um das 6-fache gegenüber der normalen Leber erhöht (Sydow und Fey 1969). Von diesen Autoren wurden die Geschlechtsunterschiede als Argument gegen eine vorrangige Bedeutung des Glykogenstoffwechsels für die Kanzerogenese angeführt.

Dem Stadium erhöhten Glykogengehaltes folgt mit dem Auftreten cytologischer Malignitätszeichen in den Mikrokarzinomen ein starker Glykogenschwund. Die basophilen, kleinkernigen Zellen sind von diesem Zeitpunkt an auch zu keiner Resynthese des Glykogens mehr fähig (Grundmann und Sieburg 1962, Bannasch 1967, Friedrich - Freksa 1969), was vielleicht als Zeichen eines neuen Enzymdefektes in der Glykogensynthese zu deuten wäre. Das in den Zellen gespeicherte Glykogen könnte auf anderen Stoffwechselwegen, etwa der anaeroben Glykolyse abgebaut worden sein.

In ausgebildeten Karzinomen kann der Glykogenverlust verschieden stark ausgeprägt sein. Friedrich - Freksa fand in einer Versuchsreihe nach kontinuierlicher DÄNA - Anwendung Tumoren ohne Glykogen, solche mit verringertem oder normalem Glykogen und sogar einen mit verstärkter Glykogenspeicherung. In den 2-Fluorenenacetylamid- und Äthionin - induzierten hepatozellulären Karzinomen dagegen ist der Glykogengehalt gegenüber der normalen Leber durch-

wegs auf 1% erniedrigt (Epstein et al. 1967). Dazu passen auch Befunde von Reuber und Firminger (1963) und Reuber (1965), nach denen langsam wachsende, stark glykogenhaltige transplantable Tumoren im Laufe mehrerer Passagen ihr Glykogen verlieren und zugleich ihre Wachstumsgeschwindigkeit erhöhen.

#### 1.1.10. Protein- und Nukleinsäurestoffwechsel

Wie bereits erwähnt, kommt es schon nach einer einmaligen Dosis von DMNA zu einer Hemmung der Proteinsynthese, meßbar an einer Abnahme der Inkorporation von  $^{14}\text{C}$ -markierten Aminosäuren (Magee 1958). Auch Brouwers und Emmelot (1960) wiesen einen inhibitorischen Effekt des DMNA auf die Proteinsynthese an Kernen und Mitochondrien im zellfreien System nach.

Anwendung von DÄNA dürfte ähnliche Befunde erbringen.

Nach einem vorübergehenden Absinken der  $^3\text{H}$ -Leuzin - Inkorporation in die Leber zu Beginn der DÄNA - Kanzerogenese werden später wieder Werte wie bei normalen Kontrolltieren erreicht (Brière und Daoust 1970). Auch während der Buttergelbkanzerogenese und in 2-Acetylaminofluoren - induzierten hyperplastischen Knötchen läßt sich in späteren Stadien ein gesteigerter nukleärer und cytoplasmatischer Eiweißstoffwechsel nachweisen. Die vermehrte RNS - Synthese vermag jedoch nicht den Verlust an cytoplasmatischen Nukleoproteiden auszugleichen (Hempel et al. 1962).

Eine bemerkenswerte qualitative Veränderung im Eiweißstoffwechsel während der 2-Acetylaminofluoren - induzierten Kanzerogenese ist das Auftreten von alpha-Fetoprotein (Okita et al. 1974), das sonst nur in fötaler Leber und in Hepatomen und anderen Tumoren

vorkommt. Abelev et al. (1963) fanden dieses Protein erstmals in transplantablen Hepatomen der Maus. Seine Bedeutung für den kanzerogenen Prozeß ist noch unbekannt.

In den ersten Wochen der DÄNA - Kanzerogenese ist auch der Nukleinsäurestoffwechsel deutlich herabgesetzt, vor allem der Einbau von Nukleinsäurevorstufen in die RNS (Kröger und Kessel 1968). In späteren Stadien der Kanzerisierung ist die RNS - Synthese jedoch wieder gesteigert, was besonders deutlich in den Enzymbereichsbezirken nachgewiesen werden kann. Hier fanden Schauer und Kurze (1968) in autoradiographischen Untersuchungen einen um das 6-fache gegenüber der Umgebung erhöhten Einbau von  $^3\text{H}$ -Cytidin in die Zellkerne. Nach einer längeren radioaktiven Versuchszeit findet sich die Markierung ebenso über dem Cytoplasma. Es besteht also keine Permeabilitätsstörung der Kernmembran oder ein Retentions- und Stapelungsprozeß, der die erhöhte Kernmarkierung verursacht hätte. Eine solche Störung der Migration von RNS aus dem Kern war von Stöcker (1963) bei Versuchen mit Thioacetamid an der Rattenleber beschrieben worden.

Für den Anstieg der nukleolären RNS - Synthese soll, zumindest im Falle der Dimethylaminoazobenzol - Kanzerogenese, eine Aktivitätssteigerung der RNS - Polymerase verantwortlich sein (Godwin et al. 1967).

Auch die DNS - Synthese wird während der DÄNA - Kanzerogenese quantitativ verändert. Coté et al. (1962) bestimmten bei adulten Ratten nach einer Dauerbehandlung mit DÄNA den  $^3\text{H}$ -Thymidin - Markierungsindex der Hepatocyten nach Pulsmarkierung. Die ermittelten Werte stiegen dabei vom 0. bis zum 130. Fütterungstag von 0,2%

auf 4.03% an. In den später erscheinenden Mikrokarzinomen erreichte der TdR<sup>3</sup>H-MI sogar 15%. Eine initiale Depression des TdR<sup>3</sup>H-MI von einigen Tagen fanden Rajewsky (1967) bei in vitro - Untersuchungen und Friedrich - Freksa (1970) nach DÄNA - Gabe in vivo.

Die qualitative Veränderung der Nukleinsäuren durch die alkylierende Wirkung der Nitrosamine wurde bereits angesprochen. Quantitative Analysen der einzelnen alkylierten Basen ergaben nach Injektion von <sup>14</sup>C-markiertem DMNA folgende Verteilung der Methylierungsprodukte: 85 - 90% Methylguanin, 3 - 6% Methyladenin und 2 - 3% Methylcytosin (Lawley et al. 1968). Das Verhältnis der Alkylierung von Leber - DNS und Leber - RNS ist für die jeweiligen Kanzerogendosen etwa konstant und spricht für ein leichtes Eindringen des alkylierenden Reaktionsproduktes in den Kern (Craddock 1969). Farber et al. (1967) fanden, daß die t-RNS, zumindest nach Gabe von Äthionin, von der Alkylierung am stärksten betroffen ist. Craddock und Magee (1965) untersuchten den zeitlichen Ablauf der Nukleinsäuren - Methylierung. Sie fanden für die DNS einen steilen Anstieg und ein Maximum bereits nach 5 Stunden; daran schließt sich ein steiler Abfall an und nach 12 Stunden ist kaum noch methylierte DNS vorhanden. Bei der RNS ist sowohl der Anstieg als auch der Abfall langsamer, und noch nach 3 Wochen kann man geringe Mengen methylierter RNS in der Leber nachweisen.

Eine eventuell bedeutsame Veränderung im Nukleinsäurestoffwechsel könnte der Abfall der Nukleasen sein. Während der Kanzerogenese mit Azofarbstoffen kommt es zu einem progressiven Verlust der

aktiven Ribonukleasen und kurz vor dem Einbruch der malignen Transformation zu einem abrupten Verlust der aktiven Desoxyribonukleasen (Amano und Daoust 1961). Auch in anderen malignen Tumoren, wie z.B. Novikoff - Hepatom, Walker - Sarkom 256, Murphy - Sturm - Lymphosarkom, Solider Ehrlich - Tumor u.a. konnte mit histochemischen und biochemischen Methoden ein völliger Aktivitätsverlust beider Nukleasen nachgewiesen werden (Daoust und Amano 1963, Ambellan und Hollander 1966).

Von Taper et al. (1971) wird vermutet, daß die Nukleasen die genetische Stabilität der Zellen gegenüber der Wirkung transformierender Nukleinsäuren zu schützen haben. Ein Verlust der Nukleasen könnte somit die sofortige und irreversible maligne Transformation der präneoplastischen Zellen zur Folge haben.

## 1.2. EINFLUSS DER PROLIFERATION AUF DIE KANZEROGENESE

### 1.2.1. Nachweis der Tumorentstehung nach Proliferationsreiz (Literaturbeispiele)

Nimmt man als Ursache der Krebsentstehung eine somatische Mutation, also eine Veränderung der DNS an, so erscheint es selbstverständlich, daß die veränderte DNS sich reduplizieren und die Zelle sich teilen muß, um aus einer vorübergehenden eine fixierte, erbliche Mutation zu machen. Berenblum (1957) betont, daß die potentiell neoplastische Zelle solange zur Proliferation stimuliert werden müsse, bis der neoplastische Clon eine "kritische Größe" erreicht habe.

Die Leber als parenchymatöses Organ hat jedoch einen weitaus geringeren Zellumsatz als z.B. die Haut. Deshalb können viele Schäden an der DNS bereits durch enzymatische Exzision und andere Mechanismen repariert werden, bevor die Zelle zur Teilung kommt.

Als standardisiertes Modell zur Anregung der Proliferation der Leberzellen hat sich die von Higgins und Andersson (1931) entwickelte partielle Hepatektomie bewährt. Die Entfernung zweier Leberlappen entspricht 68% des Gesamtparenchyms und stellt einen überschweligen Proliferationsreiz dar.

Es gibt zahlreiche Beispiele für die Induktion von Lebertumoren, die ohne Hepatektomie ausbleiben würden. So erzeugt z.B. N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff nach wiederholter Gabe Tumoren in Gehirn, Rückenmark und peripheren Nerven (Druckrey et al. 1965), während eine einzelne Injektion an der erwachsenen Ratte für Magen, Darm, Niere, Haut, Herz, Harnblase, Lunge und lymphatisches Gewebe kan-

zerogen wirkt (Leaver et al. 1969, Schreiber et al. 1972). In der ruhenden Leber verursacht Methylnitrosoharnstoff keine Tumoren, nicht einmal bei Injektion in die Pfortader (Lijinsky et al. 1972). Möglicherweise findet eine initiiierende Reaktion statt, aber die Leber ist zum Zeitpunkt der Behandlung nicht empfindlich. Führt man jedoch 24 Stunden vor der Kanzerogengabe eine 2/3 - Hepatektomie durch, so entstehen bei einem Teil der Tiere Leberzelladenome und Gallengangszystadenome (Craddock und Frei 1974). Sogar das 2-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzol, das überhaupt nicht für kanzerogen gehalten worden war, erzeugt Hepatome, wenn es nach Hepatektomie an Ratten verfüttert wird (Warwick 1967).

Nach partieller Hepatektomie kann einerseits ein sonst inaktiver Stoff Hepatome hervorrufen, andererseits ein Kanzerogen, das in einer Einzeldosis unwirksam ist, wirksam werden (Marquardt et al. 1970, Craddock 1971, 1973a). Letzteres ist zum Beispiel beim Dimethylnitrosamin der Fall. Dieses Kanzerogen erzeugt bei der erwachsenen Ratte nach einmaliger Injektion keine Hepatome, sondern nur Nierentumoren. Nach Hepatektomie gegeben, produziert DMNA hepatozelluläre Karzinome in einer knotig regenerierenden Leber; nebenbei entstehen auch gelegentlich in der Bauchwand Sarkome aus den sich teilenden Fibroblasten (Craddock 1971).

Ein weiterer auffälliger Befund ist die erhöhte Rate an Nierentumoren nach Hepatektomie mit nachfolgender DMNA - Gabe. Dies wird damit erklärt, daß nach der Entfernung eines Teils der Leber mehr Kanzerogen für die Wirkung auf die Nieren zur Verfügung stehe (Rabes et al. 1971, Meister und Rabes 1973).

Paschkis et al. (1959) dagegen halten es für möglich, daß die

Wachstumsanregung nach Teilhepatektomie nicht leberspezifisch ist, sondern auch andere Organe, z.B. die Niere betrifft. In diesem Falle wäre die erhöhte Rate an Nierentumoren auf die Anregung von Zellteilungen zurückzuführen.

Als Ausnahme in dieser Reihe von Kanzerogenen ist das DÄNA zu nennen: Eine einzige Injektion von Diäthylnitrosamin vermag Lebertumoren zu erzeugen, und eine vorausgehende Hepatektomie erhöht die Anzahl der entstehenden Karzinome nicht wesentlich (Craddock 1975). Möglicherweise gehen die äthylierten Basen, vor allem das O<sup>6</sup>-Äthylguanin besonders langsam verloren, so daß auch die niedrige Zellteilungsrate der ruhenden Leber ausreichen würde, um den Schaden an der DNS zu fixieren.

Auch die Tatsache, daß wiederholte Kanzerogengaben ohne Hepatektomie zu Tumoren führen, widerspricht nicht der Auffassung von der Notwendigkeit der Zellteilung für die Kanzerogenese. Durch die toxische Komponente eines Kanzerogens werden nämlich ständig Einzelzellnekrosen verursacht, die die Leber durch eine gewisse kompensatorische Wachstumsaktivität auszugleichen sucht (Craddock 1973).

Führt man aber während einer kontinuierlichen Kanzerogenfütterung zusätzlich eine Teilhepatektomie durch, so kann sowohl die Latenzzeit bis zum Auftreten von Tumoren verkürzt als auch das Größenwachstum der Tumoren gefördert werden (Hoffmann 1970, Rabes et al. 1970). Paschkis et al. (1959) z.B. berichten über eine deutliche Wachstumszunahme von Walker - Tumoren und transplantablen Morris 3924-C-Hepatomen in teilhepatektomierten Ratten.

### 1.2.2. Ablauf der Regeneration

Nach einer 2/3 - Hepatektomie wird in den verbleibenden Leberzellen eine Welle von Mitosen hervorgerufen, deren Maximum das Ausmaß malignen Wachstums erreicht (Rabes 1969, 1976). Nach wenigen Tagen ist der Parenchymverlust durch diese exzessive Proliferation ausgeglichen (Grisham 1962, Rabes und Brändle 1969), und der Mitoseindex fällt ab, sobald das ursprüngliche Gewicht wieder erreicht ist.

Der Grad an Synchronität der DNS - synthetisierenden Zellen ist begrenzt und übersteigt nie 30 - 40% (Rabes et al. 1976). Der Grund dafür ist wahrscheinlich, daß neben den proliferationspezifischen Synthesen auch noch die normalen Stoffwechselfunktionen aufrechterhalten werden müssen (Tuczek et al. 1975). Außerdem ist das Ausmaß der DNS - Synthese noch vom Alter, Ernährungszustand und hormonellen Status der Tiere abhängig. Von besonderer Bedeutung ist natürlich das Ausmaß der resezierten Leber (Bucher und Swaffield 1964). Eine 1/3 - Resektion stellt einen unterschwelligen Proliferationsreiz dar, der nur einen geringen Grad an Synchronität hervorruft, während bei einer 90%igen Resektion überhaupt keine Zellen mehr in die DNS - Synthese eintreten, da das Parenchym funktionell überlastet ist (Tuczek und Rabes 1971).

Mit autoradiographischen Methoden, unter Verwendung von tritiiertem Thymidin, kann man die Teilnahme der Einzelzellen am Anstieg der DNS - Syntheseaktivität ermitteln. Nach der Entfernung von 2/3 der Leber erscheinen die ersten markierten Zellen nach 15 - 18 Stunden, ein erster Gipfel wird zwischen 24 und 28 Stunden

beobachtet (Grisham 1962, Oehlert et al. 1962, Fabrikant 1968), daran schließt sich nach 42 Stunden ein Abfall an.

Innerhalb eines Leberläppchens sind die DNS - synthetisierenden Zellen 18 Stunden nach der Operation in charakteristischer Weise verteilt: In einer periportal Zone I werden 80% der markierten Zellen gefunden, in der intermediären Zone II 15% und in der an die Zentralvene angrenzenden Zone III nur 5%. Diese Verteilung hängt vermutlich mit funktionellen Unterschieden in den einzelnen Bereichen des Leberläppchens zusammen (Reith et al. 1968, Pette und Brandau 1966, Rabes 1976) und nicht zuletzt auch vom wachsenden Abstand von der A. hepatica und somit dem  $O_2$ -Gradienten des Blutes (Nolte und Pette 1972, Fischer 1963). Denkbar wäre auch die Existenz eines regulierenden humoralen Faktors, der das Portalfeld auf dem Blutwege zuerst erreicht (Sigel et al. 1968).

Von der bevorzugten Zone I aus läuft die Proliferationswelle nun über das Leberläppchen bis zur Zone III, wo sie 40 Stunden nach Hepatektomie mit einem Synchronisationsgrad von 20% ihr Maximum erreicht. Währenddessen fällt die Kurve in Zone I bereits wieder ab, und nach 48 Stunden tritt auch in Zone III ein Abfall ein (Rabes und Tucek 1970, Rabes et al. 1976).

Zum gleichen Zeitpunkt beginnt am Periportalatfeld eine zweite Synchronisationswelle, die 56 Stunden nach Hepatektomie kongruent ist mit der Verteilung, die nach 18 Stunden gefunden wurde (Rabes und Tucek 1970). Die Teilnahme der Zellen an dieser zweiten Welle nimmt aber in Richtung auf das Läppchenzentrum ständig ab, als Zeichen eines Synchronisationsverlustes.

Verantwortlich dafür ist die Variabilität der Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen. Nach der Quastler - Sherman - Methode (1959)

kann die Dauer der DNS - Synthesezeit  $S$ , der prämitotischen Phase  $G_2$  und der Mitosephase  $M$  bestimmt werden. Die Werte von  $t_S$  schwanken je nach Autor zwischen 7,2 und 8,5 Stunden,  $t_{G_2}$  beträgt 2 - 3 Stunden und die Mitosezeit  $t_M$  0,8 - 2 Stunden (Grisham 1969, Stöcker und Pfeifer 1967, Rabes et al. 1972, Rabes et al. 1976). Die Synthesen während der  $G_2$ -Phase und der Mitose sind in hohem Maße von der Energieversorgung abhängig (Tobey et al. 1971), was die Verzögerung in den schlechter versorgten perivenösen Bezirken erklärt. Für den gesamten Zellzyklus wurde eine Dauer von etwa 30 Stunden ermittelt (Rabes et al. 1976).

Die am stärksten variable Phase ist  $G_1$ ; sie ist in der periportal Zone, wo die optimalen Bedingungen für den Eintritt in die  $S$  - Phase vorhanden sind, am kürzesten, nimmt umgekehrt proportional mit dem sinkenden  $O_2$ -Gradienten zu und ist in den perivenösen Zellen doppelt so lange wie periportal.

Durch spezielle experimentelle Kunstgriffe ist es möglich, die DNS - synthetisierenden Zellen in höherem Maße zu synchronisieren. Gibt man das Lebergift Allylformiat zusammen mit Teilhepatektomie, um in der verbleibenden Leber zusätzlich die periportale Zone zu zerstören, so werden in den mittleren Läppchenbereichen bis zu 70% der Zellen in der DNS - Synthese gefunden (Rabes und Tuczek 1971). Mit einer Dauerinfusion von Hydroxyharnstoff gelingt es sogar, die Leberparenchymzellen an der Grenze von  $G_1$  nach  $S$  aufzulau- fen zu lassen. Nach Wegnahme des Blocks beginnen die Hepatozyten in einem hohen Grad an Synchronie mit der DNS - Synthese. Durch diese Methode ist es möglich, die gesamte Wachstumsfraktion der regenerierenden Leber in der  $S$  - Phase zu vereinigen.

### 1.2.3. Verschiedene Empfindlichkeit der Zellzyklusphasen

Da die Leberzellen schon durch die Hepatektomie in gewissem Maße synchronisiert sind, werden durch Kanzerogengabe zu verschiedenen Zeiten nach der Leberresektion auch verschiedene Zellzyklusphasen besonders stark betroffen. Es gibt viele Hinweise, die für eine erhöhte Empfänglichkeit der Zellen in der S - Phase des Zellzyklus sprechen (Frei und Ritchie 1964, Hennings et al. 1973). Methylnitroso-N-Guanidin dagegen transformiert Fibroblasten in Zellkultur am wirkungsvollsten an der Grenze von G<sub>1</sub> nach S (Bertram und Heidelberger 1974).

Verabreicht man eine Einzeldosis DMNA nach partieller Hepatektomie, so entstehen bei etwa 40 - 60% der Versuchstiere hepatozelluläre Karzinome. Dabei ist die Tumorausbeute bei einer Kanzerogenapplikation 24 - 31 Stunden nach Hepatektomie weitaus höher als nach 6 Stunden. Auch die Anzahl der erzeugten Enzymausfallsbezirke wird durch Hepatektomie 24 Stunden vor einer DÄNA - Gabe auf das 5 - 10-fache erhöht (Scherer und Emmelot 1975). Nach 6 Stunden befinden sich die Zellen nämlich in der frühen präreplikativen Phase, während nach 24 Stunden das Maximum der DNS - Synthese betroffen ist. Zu beachten ist natürlich der Zeitraum, der benötigt wird, um das Kanzerogen in die aktive Form überzuführen (Craddock 1973, 1975a).

Das Ausmaß, die Dauer, das Verteilungsmuster und die Verlustrate der alkylierten Basen ist vom Zeitpunkt der DMNA - Gabe unabhängig (Craddock 1975b). Dies legt den Schluß nahe, daß der unterschiedliche biologische Effekt zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hepatektomie nicht in einer unterschiedlichen DNS - Alkylierung zu su-

chen ist, sondern darin, daß sich nach 24 Stunden die DNS gerade verdoppelt, wenn die Alkylierung einsetzt.

#### 1.2.4. Auswirkungen des DÄNA auf die Proliferation

Während in unbehandelten Tieren die DNS - Synthese etwa 16 Stunden nach Hepatektomie beginnt und nach 24 Stunden einen Höhepunkt erreicht, üben viele Kanzerogene einen hemmenden Effekt auf die DNS - Synthese aus (Slaga et al. 1973). Sowohl kontinuierliche als auch einmalige Kanzerogenapplikation kann somit die Regeneration beeinflussen. Mohr et al. (1968) und Rabes et al. (1970) fanden heraus, daß Dauerbehandlung mit DÄNA das Ausmaß der Leberregeneration herabsetzt. Bereits durch eine kurzdauernde niedrig dosierte DÄNA - Behandlung verlieren besonders die intermediär und zentral liegenden Leberzellen die Fähigkeit, auf den durch die Teilhepatektomie ausgeübten Proliferationsreiz in physiologischer Weise zu reagieren. In einer als Folge einer DÄNA - Behandlung zirrhotischen Leber wurde in autoradiographischen Untersuchungen ein zwar verfrühtes, aber stark erniedrigtes Maximum der DNS - synthetisierenden Zellen gefunden (Mohr et al. 1967).

Eine einmalige Gabe von DMNA 6 Stunden nach Operation verringert die DNS - Synthesewelle in hohem Maße, und auch nach 24 Stunden wird der <sup>3</sup>H-Thymidineinbau nach 1 - 2 Stunden Verzögerung herabgesetzt. Ein ähnlicher Effekt wird durch DÄNA - Behandlung hervorgerufen (Craddock 1975b). Scherer und Emmelot (1975) fanden als Folge einer Einzeldosis DÄNA von 50mg/kg nach Hepatektomie eine deutliche Verringerung der Leberregeneration, gemessen an Lebergewicht und DNS - Gehalt.

Eine Methyl - Methansulfonat - Gabe in der früh - präreplikativen Phase verzögert die DNS - Synthesewelle um 8 Stunden, sie erreicht dann aber dasselbe Ausmaß wie bei unbehandelten Tieren. Während der DNS - Synthesephase gegeben, setzt Methylmethansulfonat jedoch das Ausmaß der Synthesewelle rasch herab (Craddock 1974b).

Möglicherweise resultiert die Herabsetzung der DNS - Synthese aus der Hemmung von Enzymen, die für diesen Prozeß notwendig sind. Die Synthese von Thymidinkinase (Fausto et al. 1965) und DNS - Polymerase (Lynch et al. 1973) beginnt normalerweise im Zeitraum vor dem Beginn der DNS - Synthese anzusteigen. In der Tat konnte gezeigt werden, daß schon eine geringe DMNA - Dosis die hydrocortison - induzierte Tryptophan - Pyrrolase für einige Tage herabsetzt (Shank 1968).

Bis jetzt erscheint es aber noch unklar, ob das Verhalten der Leberzellen auf einen durch das Kanzerogen verursachten Verlust der Regulationsfähigkeit zurückzuführen oder lediglich als Ausdruck einer unspezifischen Schädigung zu werten ist.

#### 1.2.5. Tumorwachstum und Leberregeneration

Als eines der wichtigsten Merkmale des Krebses wird die Wachstumsautonomie und Indifferenz gegenüber homöostatischen Kontrollmechanismen angesehen. Ein gutes Modell für die Modifikation des Einflusses homöostatischer Regulationen ist die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (Bucher 1963).

Zu Beginn der Kanzerogenese reagieren die durch das Kanzerogen veränderten oder präneoplastischen Zellen noch äußerst lebhaft

auf den Wachstumsreiz. In Versuchen von Scherer et al. (1972) erhöhte die Entfernung von  $1/3$  der Leber die Inselzahl um das 5-fache, eine  $2/3$ -Resektion um das 10-fache.

Auch zu späteren Zeitpunkten reagieren die induzierten Inseln auf den Wachstumsreiz, obwohl sie durch eine verkürzte Populations - Verdopplungszeit schon eine gewisse Wachstumsautonomie andeuten. Untersuchungen von Rabes et al. (1970) zeigten, daß bei kontinuierlicher DÄNA - Fütterung bis zum 90. Tag die Inseln in der ruhenden Leber keine erhöhte Proliferation gegenüber der Umgebung aufweisen, und auf Teilhepatektomie mit DNS - Synthese in nahezu allen Zellen reagieren. Danach beginnt die endogene Proliferation schrittweise in einzelnen Inseln, bis etwa am 130. Tag alle Inseln einen erhöhten Markierungsindex aufweisen. Gleichzeitig mit dem Anstieg der endogenen Proliferation geht die Induzierbarkeit der DNS - Synthese verloren, so daß am 130. Tag der Markierungsindex in den Inseln nach Hepatektomie kaum höher ist als ohne Wachstumsreiz. Im Verlauf der Kanzerogenese werden die Leberzellen zur endogenen Proliferation fähig in demselben Ausmaß, wie sie ihre Abhängigkeit von höheren organspezifischen Kontrollmechanismen verlieren.

In hyperplastischen Knötchen, die durch 2-Acetylaminofluoren hervorgerufen wurden, zeigt sich jedoch sowohl zu frühen als auch späten Zeitpunkten eine lebhaftere Antwort auf Teilhepatektomie als in normaler Leber (Becker und Klein 1971).

Durch Untersuchungen mit der die DNS - Synthese hemmenden L-Asparaginase konnte bewiesen werden, daß die meisten Zellen in den Knötchen wie normale Zellen reagieren, einige reagieren jedoch anders. Eine genaue Analyse des Wachstumsverhaltens dieser fehl-

reagierenden Zellen wäre notwendig und aufschlußreich.

Auch Laws (1959) beschreibt nach Teilhepatektomie ein verstärktes Wachstum von 2-Acetylaminofluoren - induzierter nodulärer Hyperplasie; gleichzeitig ist auch das Auftreten von Tumoren beschleunigt. Kitigawa (1971) fand bei der Untersuchung von hyperplastischen Knötchen, daß keines völlig die Fähigkeit verloren hatte, auf Hepatektomie mit Zellteilungen zu reagieren, parallel zu ihrer zunehmenden Größe zeigten sie jedoch eine Tendenz zur schrittweisen Abnahme ihrer Ansprechbarkeit auf den Wachstumsreiz.

Bei ausgeprägten Tumoren, wie z.B. dem Jensen - Sarkom und dem Murphy - Sturm Lymphosarkom wird auf Hepatektomie kein Anstieg des Wachstums mehr beobachtet. Auch Hepatome und präkanzeröse Leberbezirke während der 3-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzol - Kanzerogenese zeigten sich in Untersuchungen von Maini und Stich (1962) unansprechbar.

Es gibt auch eine Reihe von exogenen und endogenen Faktoren, die während der Krebsentstehung zur Wirkung gelangen und vor allem den zeitlichen Ablauf beeinflussen. So ist z.B. das Alter der Versuchstiere von großer Bedeutung: Neugeborene Tiere sind gegenüber der Wirkung von Kanzerogenen weit empfindlicher als erwachsene. Dies mag einerseits mit einer höheren Zellteilungsrate zusammenhängen, andererseits mit einem bei der Geburt noch nicht voll entwickelten Immunsystem. Für die letztere Annahme sprechen Ergebnisse von Burstein und Allison (1969) und Law (1970), die beweisen, daß die Anwendung von Antilymphozytenserum die Entwicklung bestimmter Tumoren beschleunigen kann. Einen ähnlichen Effekt beschreiben Roe und Grant (1970) nach neonataler Thymektomie. Auch

die Zahl und Größe von hyperplastischen Enzymausfallsbezirken kann durch Kombination von DÄNA mit Antilymphozytenserum vom Kaninchen gesteigert werden (Friedrich - Freksa und Hoffmann 1969) .

### 1.3. ALLGEMEINE FRAGESTELLUNG

#### UND SKIZZIERUNG DES VERSUCHSMODELLS

In zahlreichen standardisierten Versuchsmodellen der experimentellen Kanzerogenese wurden bereits vor dem Auftreten eindeutiger Malignitätszeichen morphologische, funktionelle und proliferationskinetische Veränderungen der Leberzellen beobachtet und untersucht. Hierbei muß unterschieden werden zwischen unspezifischen Veränderungen, die keine Relevanz für die Kanzerogenese haben und solchen, die in kausalem Zusammenhang mit der Krebsentstehung stehen.

Prinzipiell können hier zwei verschiedene Arten von Versuchsmodellen zur Krebserzeugung gegenübergestellt werden: Einerseits ist es möglich, an der ruhenden Leber durch eine kontinuierliche oder diskontinuierliche Kanzerogenapplikation in nicht toxischen Tagesdosen nach einer je nach Kanzerogen verschieden langen Latenzzeit präneoplastische Veränderungen und hepatozelluläre Karzinome zu erzeugen.

Beschränkt man sich andererseits auf eine einmalige hochdosierte Kanzerogengabe, so muß dieser meist ein Wachstumsreiz, dargestellt durch eine standardisierte Teilhepatektomie, vorausgehen, wenn Lebertumoren entstehen sollen. Wichtig ist hierbei die Wahl des Zeitpunktes der Kanzerogenapplikation, denn die Zellen müssen sich in einem empfindlichen Stadium des Zellzyklus befinden, um den an ihnen entstandenen Schaden an die Tochterzellen weiterzugeben.

In der hier vorgelegten Arbeit sollen die Auswirkungen eines Proliferationsreizes auf das Wachstumsverhalten von potentiell prä-

neoplastischen Zellpopulationen untersucht und ihre Entwicklung in Bezug auf maligne Entartung beobachtet werden.

Die Initiierung dieser Zellen geschieht durch eine niedrig dosierte, kurzdauernde Kanzerogenapplikation von 5mg DÄNA/kg/Tag für 15 bzw. 30 Tage. Ohne weitere Behandlung würden nach dieser Kanzerogenmenge kaum bleibende Veränderungen resultieren.

Durch eine unmittelbar folgende 2/3 - Hepatektomie werden die so vorgeschädigten Zellen jedoch zur Proliferation stimuliert, so daß die Veränderungen, sei es am genetischen Material, sei es an anderen Zellbestandteilen, fixiert und als bleibende Schäden an die Tochterzellen vererbt werden könnten. Solche Schäden, in diesem Falle am Enzymmuster und somit an der funktionellen Leistung der Zellen können mit Hilfe von enzymhistochemischen Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hepatektomie wird eine Anzahl von Versuchstieren mit Injektionen von radioaktiv markiertem Thymin entsprechend einer Dauerinfusion behandelt. Die aus den Lebern dieser Tiere gewonnenen histologischen Schnitte werden nach der Herstellung von Autoradiographien und Enzympräparaten vergleichend untersucht. Hierbei liegt das wesentliche Ziel darin, durch Ermittlung der DNS - Syntheseaktivität und somit der Proliferationsaktivität in den Enzymausfallsbezirken Aufschlüsse über deren Wachstumsverhalten in verschiedenen Stadien der Präneoplasie und der Kanzerogenese zu erhalten. Auch durch direkten Vergleich der Größe und Anzahl der Enzymausfallsbezirke zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hepatektomie ist eine Beurteilung des Wachstums möglich.

Eine Kontrollgruppe von Tieren wird nach 15- bzw. 30-tägiger DÄNA - Fütterung mit anschließender Hepatektomie ohne weitere Behandlung beobachtet, um Aussagen über die Überlebenszeit und die langfristige Entwicklung von Karzinomen aus den oben beschriebenen Veränderungen machen zu können.

## 2. EXPERIMENTELLER TEIL

### 2.1. MATERIAL UND METHODE

#### 2.1.1. Verwendete Versuchstiere und DÄNA - Fütterung

100 männliche Ratten des Stammes Wistar AF/Han mit einem Anfangsgewicht von 90 - 110 Gramm erhielten Altromin - Standarddiät und im Trinkwasser 5mg DÄNA/kg/Tag. Diäthylnitrosamin wurde von Merck - Schuchardt, Darmstadt bezogen. Die benötigte Menge der DÄNA - Stammlösung (3g/l) wurde durch wöchentliche Wägung anhand einer Tabelle ermittelt.

Die DÄNA - Fütterung wurde bei der Hälfte der Tiere 15 Tage, bei der anderen Hälfte 30 Tage lang durchgeführt. Die DÄNA - Gesamtdosis betrug somit 75mg/kg bzw. 150mg/kg, was bei dem Gewicht der Tiere einer durchschnittlichen Menge von 8,6mg bzw. 20,5mg entsprach (siehe Abb. 1)

#### 2.1.2. Durchführung der Teilhepatektomie

Nach 15 bzw. 30 Tagen DÄNA - Fütterung wurden je 50 Tiere in Äthernarkose nach der Methode von Higgins und Andersson (1931) 2/3 - hepatektomiert. Hierbei wird nach Abbinden am Hilus der lobus medialis und der lobus sinistrolateralis entfernt; es verbleiben der lobus dextrolateralis, der lobus caudatus und der processus papillaris. Alle Operationen erfolgten zwischen 8<sup>00</sup>

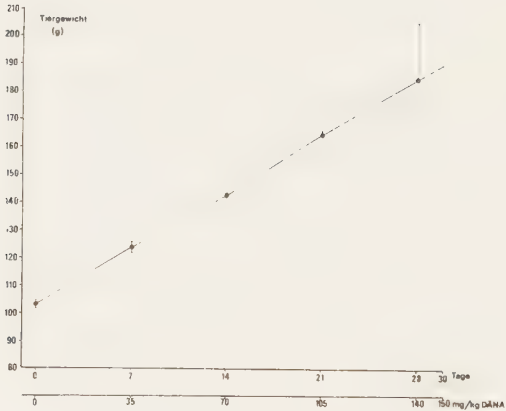


Abb.1: Darstellung der Gewichtszunahme der Versuchstiere und Kumulation der DÄNA - Dosis während der Dauer der Kanzerogenapplikation.

Abszisse: Tage nach Beginn der DÄNA - Fütterung und Kumulation der DÄNA - Dosis

Ordinate: Gewicht der Versuchstiere mit mittlerem Fehler des Mittelwerts

und 12<sup>00</sup> Uhr. Nach der Operation erhielten die Tiere nur noch Altromin - Standarddiät und Trinkwasser, jedoch kein DÄNA mehr.

### 2.1.3. Markierung mit <sup>3</sup>H-TdR

a) Von den Ratten, die 15 Tage lang DÄNA erhalten hatten, wurden je 5 Tiere am 40., 100., 160., 280. und 360. Tag mit <sup>3</sup>H-TdR markiert. Während der radioaktiven Versuchszeit erhielt jedes Tier 6 intraperitoneale Injektionen von je 0,8 µCi <sup>3</sup>H-TdR/g Körpergewicht im Abstand von 6 Stunden. (Spezifische Aktivität des Thymidins: 5Ci/mM, Hersteller: Radiochemical Centre Amersham). Die Stammlösung mit 1mCi/ml aqua dest. wurde vor der Injektion durch Zusatz von Hanks - Lösung im Verhältnis 1 : 4 auf eine Aktivität von 200 µCi/ml verdünnt. Die letzte Injektion erfolgte um 7.30 Uhr, eine Stunde später wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet. Anschließend wurden die Lebern entnommen.

b) Von den Ratten, die 30 Tage lang DÄNA erhalten hatten, wurden je 5 Tiere am 10., 40., 70., 160. und 280. Tag in oben beschriebener Weise mit <sup>3</sup>H-TdR behandelt.

### 2.1.4. Anfertigung histologischer Schnitte

Der lobus dextrolateralis eines jeden Tieres wurde unmittelbar nach Entnahme bei -20°C in CO<sub>2</sub> - Schnee eingefroren. Sodann wurden je 21 Kryostat - Serienschnitte von 5 µm Dicke angefertigt und alternierend für Enzymhistochemie und Autoradiographie verwendet. Die Schnitte 1, 4, 7, .... 19 dienten zur Darstellung der histochemischen ATPase - Aktivität, die Schnitte 2, 5, 8, .. .. 20 zur Herstellung von Autoradiogrammen, die Schnitte 3, 6, 9,

.... 21 zur Darstellung der histochemischen G-6-Pase - Aktivität. Von jedem Tier wurde eine Gruppe von drei aufeinanderfolgenden Präparaten zur Auswertung ausgewählt.

#### 2.1.5. Nachweis der Enzymaktivitäten und Herstellung von Autoradiographien

Der ATPase - Nachweis erfolgte nach der Methode von Wachstein und Meisel, modifiziert nach Schubert und Rinneberg (1962). Der G-6-Pase - Nachweis erfolgte nach der Methode von Wachstein und Meisel (1954).

Die frischen Kryostatschnitte wurden 5 Minuten getrocknet, danach unter Zusatz der jeweiligen Substratlösung für 30 Minuten bei 37°C in eine Inkubationslösung getaucht und nach Spülung in lauwarmem Leitungswasser und in Aqua dest. für genau 15 Sekunden in eine Ammoniumsulfidlösung gestellt. Nach wiederholter Aqua dest. - Spülung erfolgte 10 - minütige Fixierung in Formol (10%), 10 - minütiges Wässern, schließlich Eindecken in Glycerin - Gelatine.

Die Inkubationslösung setzte sich zusammen aus:

10 ml Trismaleatpuffer (0,2M, pH 7,2)

2.0 ml Magnesiumsulfat (1,2% = 0,1M)

1,5 ml Bleinitrat (2%)

1,5 ml Aqua dest.

Die ATP - Lösung setzte sich zusammen aus:

10.0 mg Adenosin-5'-triphosphat (Kristallisiertes Dinatriumsalz

$C_{10}H_{14}N_5O_{13}Na_2 \cdot 3H_2O$ ), Boehringer, Mannheim

5,0 ml Aqua dest.

Die G-6-P - Lösung setzte sich zusammen aus:

5,0 mg Glucose-6-Phosphat (Kristallisiertes Dinatriumsalz

$C_6H_{11}O_9PNa_2$ ), Boehringer, Mannheim

5,0 ml Aqua dest.

Für die Autoradiogramme wurden die Kryostatschnitte 24 h in neutralisiertem 5%igem Formol unter Zusatz von 0,5 mg/ml inaktivem Thymidin zum Austausch mit dem nicht in die DNS eingebauten radioaktiven Thymidin fixiert. Vor dem Aufbringen des Stripping-filmes Kodak AR10 wurden die Schnitte mit einer Chromalaungelatinelösung (0,5g Gelatine, 0,05g Chromalaun in 100 ml Aqua dest.) überzogen, 27 Tage exponiert und nach dem Entwickeln mit Amidol bei 21°C, Wässerung und Fixierung mit Natriumthiosulfat getrocknet und mit Hämatoxylin - Eosin gefärbt.

#### 2.1.6. Mikroskopische Auswertung

Da sich bei der hier angewandten histochemischen Aufarbeitung die ATPase - freien Zellinseln wesentlich deutlicher darstellten als die Bezirke mit Verlust der G-6-Pase wurden für die Auswertung nur die ATPase - Präparate und die Autoradiographien herangezogen. Die Kongruenz von ATPase- und G-6-Pase - Ausfallsbezirken wurde stichprobenartig objektiviert. Für jede Versuchsgruppe sollten etwa 20 Enzymdefektbezirke untersucht werden.

Zur mikroskopischen Auswertung der Präparate wurde ein sogenanntes Maskenvergleichsgerät mit Vergleichsmikroskop der Firma Leitz benutzt. Das Gerät besitzt zwei Objektische, zwei Mikroskope und ein Binokular. Die Objektische lassen sich voneinander unab-

hängig um eine x - Achse und y - Achse verschieben und um eine z - Achse drehen. Soll eine bestimmte Stellung der Objektische zueinander beibehalten werden, lassen sie sich in der x - und y - Achse durch Kopplung der Objektische gleichsinnig verschieben.

Die Durchlichtbeleuchtungen beider Mikroskope lassen sich getrennt auf- und abblenden, um Einzelheiten eines Objekts ohne störende Überlagerung mit dem anderen beobachten zu können. Der Strahlengang beider Mikroskope wird durch ein Prismensystem parallel im Okular vereinigt, so daß zwei Serienschchnittpräparate so betrachtet werden können, als würden sie aufeinander liegen.

Im vorliegenden Versuch diene das Gerät dazu, zwei Serienschnitte mit ATPase - Reaktion und Autoradiographie vergleichend zu untersuchen.

Hierzu wurde zuerst das ATPase - Präparat auf dem linken Objektisch befestigt und bei 80-facher Vergrößerung (Objektiv 8-fach, Großfeldokular 10-fach) charakteristische Stellen aufgesucht, meist Anschnitte größerer Gefäße. In dem am rechten Objektisch befestigten Autoradiogramm mußten nun die entsprechenden Gefäßanschnitte aufgesucht und optisch mit dem Parallelpräparat zur Deckung gebracht werden, wobei durch Auf- und Abblenden der Objektiveleuchtungen die Lage der Präparate zueinander ständig kontrolliert und korrigiert werden konnte.

Bei 80-facher Vergrößerung wurde nun bei abgeblendetem Autoradiogramm das ATPase - Präparat meanderförmig nach Enzymausfallsbezirken durchsucht. Da die kleinsten mit Sicherheit diagnostizierbaren enzymdefekten Zellinseln aus etwa 8 Leberzellen beste-

hen, wurden noch kleinere Enzymdefekte nicht berücksichtigt. Mit Hilfe eines Rasterokulars mit 10 x 10 Rastereinheiten wurde bei 80- bzw. 160-facher Vergrößerung der mittlere Durchmesser der Enzymausfallsbezirke in Horizontale und Vertikale bestimmt. Vorher war durch Vergleich mit einer Eichskala die absolute Kantlänge einer Rastereinheit bei 80-facher Vergrößerung mit  $170\text{ }\mu\text{m}$  ermittelt worden und bei 160-facher Vergrößerung mit  $85\text{ }\mu\text{m}$ .

Vor der Ermittlung des Markierungsindex eines Enzymdefektbezirks mußte die Übereinstimmung der Lage der beiden Präparate noch einmal korrigiert werden, da diese meist nicht vollkommen kongruent waren.

Auf dem Autoradiogramm wurden nun bei 160-facher Vergrößerung durch meanderförmige Einzelzellauszählung die Anzahl der Parenchymzellen und die der markierten Leberzellen bestimmt, mesenchymale Zellen und Gangepithelien blieben unberücksichtigt. Die Grenzen des Enzymausfallsbezirks wurden dabei durch wiederholtes Aufblenden des ATPase - Präparates ständig kontrolliert. Bei großen Enzymdefektbezirken wurde der  $^3\text{H}$ -TdR-MI von 1000 Zellen bestimmt. Waren in einem Präparat mehr als 10 Ausfallsbezirke vorhanden, so kamen 3 große, 4 mittelgroße und 3 kleine zur Auswertung.

Die Flächen der zur Auswertung verwendeten Leberschnitte wurden mit Hilfe eines Planimeters (Firma Ott) bestimmt; zur Eichung diente Millimeterpapier. Für jedes Präparat konnte somit die Anzahl der Enzymdefektbezirke mit der Fläche des Leberschnitts in Beziehung gesetzt werden.

Außerdem wurde in jedem Präparat durch meanderförmige Auszählung

an verschiedenen Stellen, unter Aussparung der Enzymdefektbezirke, der  $^3\text{H}$ -TdR-MI von 5000 Parenchymzellen bestimmt, um diesen Wert mit dem Markierungsindex der enzymdefizienten Zellen zu vergleichen

#### 2.1.7. Ermittlung der Überlebenszeit der Kontrolltiere

Die hepatektomierten Ratten, die nicht zum radioaktiven Versuch benötigt wurden, stellten eine Kontrollgruppe dar zur Bestimmung der Überlebenszeit und Feststellung der Todesursache. Der Zeitpunkt des Todes wurde registriert; von den Organen der Tiere wurden histologische Schnitte angefertigt.

#### 2.1.8. Statistische Auswertung

Die Berechnung des Mittelwertes  $\bar{x}$  einer Stichprobe  $x_1 \dots x_n$  erfolgte nach der Gleichung:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Die Standardabweichung  $s$  wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2}$$

Für die Bestimmung des mittleren Fehlers vom Mittelwert  $s\bar{x}$  wurde folgende Gleichung herangezogen:

$$s\bar{x} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

## 2.2. ERGEBNISSE DER ENZYM HISTOCHEMISCHEN UND AUTORADIOGRAPHISCHEN UNTERSUCHUNGEN

### 2.2.1. Anzahl der Enzymdefektbezirke je cm<sup>2</sup> Schnittfläche

a) Bei den Tieren, die 15 Tage lang DÄNA erhalten hatten, enthielten am 40. und 100. Tag nach Hepatektomie etwa die Hälfte der Präparate keine Enzymdefektbezirke (EDB), die eine auswertbare Größe von mehr als 8 Zellen aufwiesen; kein Präparat enthielt zu diesen Zeitpunkten mehr als 4 EDB. Ab dem 160. Tag nach Hepatektomie enthielten alle Präparate auswertbare Defektbezirke. Aus den planimetrisch bestimmten Flächen der Leberschnitte und der Anzahl der EDB ließ sich für die jeweiligen Versuchszeitpunkte die mittlere Anzahl von EDB pro cm<sup>2</sup> Schnittfläche ermitteln.

Diese betrug am 40., 100., 160., 280. und 360. Tag nach Hepatektomie 1,0, 0,7, 1,2, 3,3 und 4,2 (siehe Tab.1 und Abb.2).

b) Nach 30-tägiger DÄNA - Fütterung enthielten die Präparate zu allen Versuchszeitpunkten Enzymdefektbezirke. Bei annähernd gleicher Präparatgröße betrug die mittlere Anzahl der EDB pro cm<sup>2</sup> Schnittfläche am 10., 40., 70., 100., 160. und 280. Tag nach Hepatektomie 1,1, 1,7, 2,4, 3,4, 3,9 und 4,3 (siehe Tab.2 und Abb.3). Diese Werte haben nur orientierenden Charakter, da für jedes Tier nur ein Präparat ausgewertet wurde.

### 2.2.2. Größe und Zellzahl der Enzymdefektbezirke

a) Die Größe der Enzymdefektbezirke wurde aus den abgezählten

Einheiten des Okular - Zählrasters für horizontalen und vertikalen Durchmesser berechnet, unter Berücksichtigung der absoluten Größe der Rastereinheiten. Sie stellt nur annähernde Werte dar, da die oft unregelmäßige Form der EDB bei dieser Methode außer acht gelassen wurde.

Nach 15-tägiger DÄNA - Fütterung betrug die mittlere Größe der EDB für den 40., 100., 160., 280. und 360. Tag nach Hepatektomie 28700, 47500, 50000, 44800 und 97900  $\mu\text{m}^2$  (siehe Tab.3 und Abb.4).

Als weiteren Parameter für die Größenentwicklung der EDB kann die in ihnen enthaltene Anzahl an enzymdefizienten Zellen herangezogen werden. Für die oben genannten Versuchszeitpunkte wurde eine mittlere Zellzahl pro EDB von 26, 25, 37, 46 und 102 ermittelt (siehe Tab.4 und Abb.5).

b) Für die Tiere, die 30 Tage lang DÄNA erhalten hatten, wurde die mittlere Größe der EDB nach der oben beschriebenen Methode berechnet. Sie betrug am 10., 40., 70., 100., 160. und 280. Tag nach Hepatektomie 27200, 61900, 75100, 57700, 159300 und 277900  $\mu\text{m}^2$  (siehe Tab.5 und Abb.6).

Die durchschnittliche Anzahl der Zellen in den Enzymdefektbezirken wurde für die genannten Versuchszeitpunkte mit 31, 78, 66, 56, 122 und 167 ermittelt (siehe Tab.6 und Abb.7).

### 2.2.3. Markierungsindex in den Enzymdefektbezirken und im normalen Parenchym

a) Der  $^3\text{H}$ -TdR - Markierungsindex der Enzymdefektbezirke wurde aus der Anzahl der markierten Hepatozyten im EDB als Prozent-

satz ihrer Gesamtzellzahl angegeben. Er betrug für die 15 Tage lang mit DÄNA behandelten Tieren 5,0, 3,7, 3,4, 5,9 und 5,2 % (siehe Tab.7 und Abb.8).

Zu denselben Zeitpunkten betrug die  $^3\text{H}$ -TdR - Markierung im normalen, nicht enzymdefizienten Parenchym 2,3, 1,3, 1,9, 1,4 und 1,3 % (siehe Abb.8).

b) Die Enzymdefektbezirke der Tiere, die 30 Tage lang DÄNA erhalten hatten, wiesen am 10., 40., 70., 100., 160. und 280. Tag nach Hepatektomie einen  $^3\text{H}$ -TdR-MI von 10,2, 5,0, 7,6, 13,3, 7,7 und 6,7 % auf (siehe Tab. 8 und Abb.9).

Der  $^3\text{H}$ -TdR-MI im normalen Parenchym zeigte zu diesen Versuchszeitpunkten Werte von 3,5, 1,8, 1,7, 2,1, 1,1 und 0,6 % (Abb.9).

| Tier       | Tage nach Hepatektomie |     |     |     |     |
|------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|
|            | 40                     | 100 | 160 | 280 | 360 |
| 1          | 0,0                    | 0,0 | 1,6 | 4,2 |     |
| 2          | 1,5                    | 1,2 | 1,7 | 3,3 | 5,0 |
| 3          | 0,6                    | 0,0 | 0,5 | 1,7 | 3,3 |
| 4          | 0,0                    | 2,7 | 1,9 | 3,8 |     |
| 5          | 2,9                    | 0,0 | 0,6 | 3,5 | 4,4 |
| n          | 5                      | 5   | 5   | 5   | 3   |
| $\bar{x}$  | 1,0                    | 0,7 | 1,2 | 3,3 | 4,2 |
| $s\bar{x}$ | 0,3                    | 0,5 | 0,3 | 0,3 | 0,5 |
| s          | 0,7                    | 1,1 | 0,7 | 0,7 | 0,9 |

Tabelle 1: Anzahl der Enzymdefektbezirke pro  $\text{cm}^2$  Leberschnittfläche zu verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie. DÄNA (5mg/kg/Tag) für 15 Tage.

| Tier       | Tage nach Hepatektomie |     |     |     |     |     |
|------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|            | 10                     | 40  | 70  | 100 | 160 | 280 |
| 1          | 1,2                    | 0,9 | 2,9 |     | 3,5 | 4,5 |
| 2          | 1,7                    | 2,4 | 0,7 | 5,3 | 2,9 | 4,4 |
| 3          | 1,0                    | 1,7 | 2,5 | 2,8 | 4,5 |     |
| 4          | 0,9                    | 1,9 | 3,0 | 2,1 | 5,0 |     |
| 5          | 0,5                    | 2,0 | 2,9 |     |     | 4,1 |
| n          | 5                      | 5   | 5   | 3   | 4   | 3   |
| $\bar{x}$  | 1,1                    | 1,7 | 2,4 | 3,4 | 3,9 | 4,3 |
| $s\bar{x}$ | 0,3                    | 0,3 | 0,4 | 0,9 | 0,6 | 0,3 |
| s          | 0,7                    | 0,7 | 0,9 | 1,6 | 1,2 | 0,5 |

Tabelle 2: Anzahl der Enzymdefektbezirke pro  $\text{cm}^2$  Leberschnittfläche zu verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie. DÄNA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage.

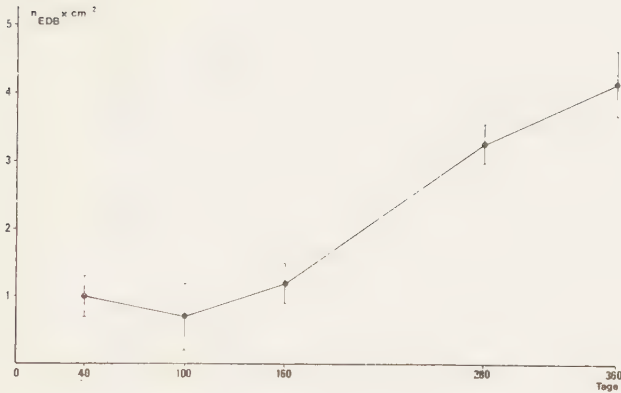


Abb.2: Bestimmung der Anzahl von Enzymdefektbezirken pro  $\text{cm}^2$  der Leberschnitte als Funktion des Zeitintervalls nach partieller Hepatektomie. Die Ratten erhielten DÄNA (5mg/kg/Tag) für 15 Tage. Absetzen des DÄNA nach Hepatektomie.

Abszisse: Tage nach Hepatektomie

Ordinate: Anzahl der Enzymdefektbezirke ( $n_{\text{EDB}}$ )/ $\text{cm}^2$  mit mittlerem Fehler des Mittelwerts

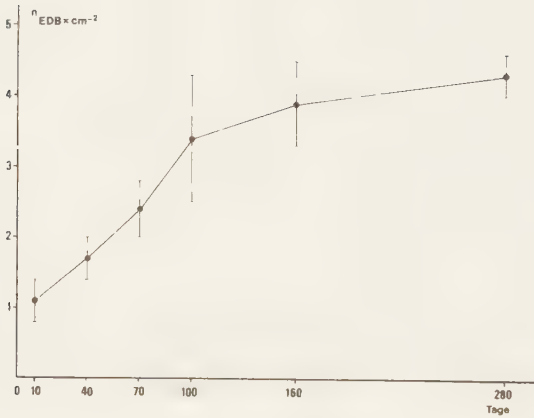


Abb.3: Bestimmung der Anzahl von Enzymdefektbezirken pro  $\text{cm}^2$  der Leberschnitte als Funktion des Zeitintervalls nach partieller Hepatektomie. Die Ratten erhielten DÄNA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage. Absetzen des DÄNA nach Hepatektomie.

Abszisse: Tage nach Hepatektomie

Ordinate: Anzahl der Enzymdefektbezirke ( $n_{\text{EDB}}$ )/ $\text{cm}^2$  mit mittlerem Fehler des Mittelwerts

| Tiere      | Tage nach Hepatektomie   |                          |                          |                                               |                                                          |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|            | 40                       | 100                      | 160                      | 280                                           | 360                                                      |
| 1          |                          |                          | 181<br>271<br>289        | 1987<br>1156<br>289<br>650<br>542             |                                                          |
| 2          | 361<br>452<br>452        | 289<br>217               | 289<br>361<br>289<br>650 | 361<br>163<br>722<br>217<br>289<br>325        | 813<br>271<br>722<br>361<br>217<br>542<br>650            |
| 3          | 163                      |                          | 433                      | 361<br>217                                    | 1878<br>163<br>1084<br>867<br>975<br>289<br>433          |
| 4          | 217<br>289               | 650<br>759<br>650<br>289 | 975<br>867<br>867<br>813 | 867<br>325<br>144<br>108<br>217<br>289        |                                                          |
| 5          | 289<br>144<br>217<br>289 |                          | 217                      | 325<br>163<br>325<br>433<br>433<br>217<br>542 | 722<br>650<br>1156<br>5780<br>1445<br>289<br>433<br>1806 |
| n          | 10                       | 6                        | 13                       | 26                                            | 22                                                       |
| $\bar{x}$  | 287                      | 475                      | 500                      | 448                                           | 979                                                      |
| $s\bar{x}$ | 34                       | 96                       | 80                       | 77                                            | 250                                                      |
| s          | 109                      | 237                      | 289                      | 396                                           | 1175                                                     |

Tabelle 3: Größe der Enzymdefektbezirke ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-2}$ ) in den ATPase - Präparaten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hepatektomie. DÄNA (5mg/kg/Tag) für 15 Tage.

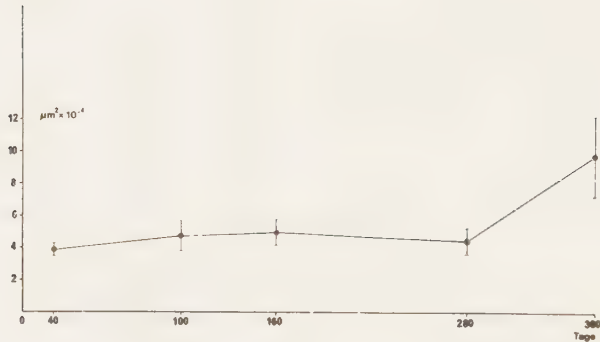


Abb.4: Größenwachstum der Enzymdefektbezirke als Funktion der Zeit nach partieller Hepatektomie. Die Ratten erhielten DÄNA (5mg/kg/Tag) für 15 Tage. Absetzen des DÄNA nach Hepatektomie.

Abszisse: Tage nach Hepatektomie

Ordinate: Größe der Enzymdefektbezirke ( $\mu m^2 \times 10^{-4}$ ) mit mittlerem Fehler des Mittelwerts

Tabelle 4

| Tiere     | Tage nach Hepatektomie |      |      |      |      |      |
|-----------|------------------------|------|------|------|------|------|
|           | 10                     | 40   | 70   | 100  | 160  | 280  |
| 1         | 217                    | 433  | 452  |      | 722  | 2601 |
|           | 144                    |      | 867  |      | 632  | 650  |
|           |                        |      | 578  |      | 1626 | 578  |
|           |                        |      | 163  |      | 1011 | 1445 |
|           |                        |      | 289  |      | 1300 | 867  |
|           |                        |      |      |      | 885  | 2529 |
|           |                        |      |      |      | 7225 | 1951 |
|           |                        |      |      |      | 1084 | 1626 |
|           |                        |      |      |      |      | 650  |
|           |                        |      |      |      |      | 3251 |
| 2         | 217                    | 217  | 217  | 757  | 542  | 867  |
|           | 271                    | 867  |      | 433  | 361  | 5852 |
|           | 271                    | 433  |      | 1138 | 813  | 7225 |
|           | 163                    | 433  |      | 650  | 1011 | 2023 |
|           |                        | 325  |      | 1156 | 722  | 4046 |
|           |                        |      |      | 289  | 722  | 1300 |
|           |                        |      |      | 650  |      |      |
|           |                        |      |      | 289  |      |      |
|           |                        |      |      | 433  |      |      |
|           |                        |      |      | 433  |      |      |
| 3         | 722                    | 1391 | 650  | 759  | 4624 |      |
|           | 506                    | 325  | 1951 | 650  | 1300 |      |
|           | 325                    | 271  | 650  | 217  | 1951 |      |
|           |                        | 1445 |      | 433  | 1734 |      |
|           |                        |      |      | 289  | 433  |      |
|           |                        |      |      |      | 2167 |      |
|           |                        |      |      |      | 2529 |      |
|           |                        |      |      |      | 1445 |      |
|           |                        |      |      |      | 5202 |      |
|           |                        |      |      |      |      |      |
| 4         | 72                     | 217  | 867  | 1445 | 433  | 7225 |
|           | 72                     | 1445 | 867  | 433  | 1806 | 2782 |
|           | 144                    | 271  | 650  | 289  | 1138 | 1806 |
|           | 578                    | 163  |      | 506  | 2529 | 3034 |
|           |                        |      |      | 289  | 867  | 867  |
|           |                        |      |      |      | 542  |      |
|           |                        |      |      |      | 1011 |      |
|           |                        |      |      |      | 2601 |      |
|           |                        |      |      |      | 542  |      |
|           |                        |      |      |      | 1084 |      |
| 5         | 108                    | 144  | 1300 |      |      |      |
|           |                        | 506  | 1445 |      |      |      |
|           |                        | 650  | 217  |      |      |      |
|           |                        | 1626 | 867  |      |      |      |
|           |                        |      |      |      |      |      |
| $\bar{n}$ | 14                     | 18   | 16   | 20   | 33   | 21   |
| $\bar{x}$ | 272                    | 619  | 751  | 577  | 1593 | 2779 |
| sx        | 53                     | 119  | 122  | 75   | 260  | 456  |
| s         | 198                    | 505  | 488  | 335  | 1495 | 2092 |

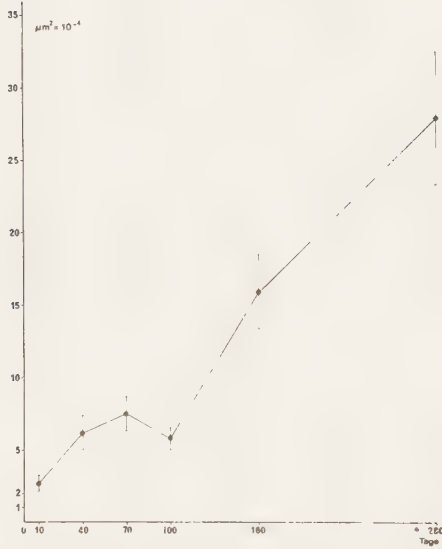


Abb.5: Größenwachstum der Enzymdefektbezirke als Funktion der Zeit nach partieller Hepatektomie. Die Ratten erhielten DÄNA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage. Absetzen des DÄNA nach Hepatektomie.

Abszisse: Tage nach Hepatektomie

Ordinate: Größe der Enzymdefektbezirke ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-4}$ ) mit mittlerem Fehler des Mittelwerts

---

Tabelle 4: Größe der Enzymdefektbezirke ( $\mu\text{m}^2 \times 10^{-2}$ ) in den ATPase - Präparaten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hepatektomie. DÄNA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage.

| Tiere      | Tage nach Hepatektomie |     |     |     |     |
|------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|
|            | 40                     | 100 | 160 | 280 | 360 |
| 1          |                        |     | 27  | 155 |     |
|            |                        |     | 29  | 128 |     |
|            |                        |     | 33  | 51  |     |
|            |                        |     |     | 31  |     |
|            |                        |     |     | 44  |     |
| 2          | 19                     | 25  | 27  | 37  | 70  |
|            | 35                     | 17  | 40  | 18  | 38  |
|            | 25                     |     | 29  | 55  | 88  |
|            |                        |     | 75  | 29  | 59  |
|            |                        |     |     | 31  | 24  |
|            |                        |     |     | 33  | 58  |
|            |                        |     |     |     | 76  |
| 3          | 13                     |     | 22  | 34  | 174 |
|            |                        |     |     | 19  | 22  |
|            |                        |     |     |     | 115 |
|            |                        |     |     |     | 65  |
|            |                        |     |     |     | 126 |
|            |                        |     |     |     | 48  |
| 4          | 35                     | 37  | 45  | 103 |     |
|            | 44                     | 31  | 47  | 55  |     |
|            |                        | 29  | 44  | 17  |     |
|            |                        | 13  | 49  | 12  |     |
|            |                        |     |     | 22  |     |
|            |                        |     |     | 40  |     |
|            |                        |     |     |     |     |
| 5          | 25                     |     | 20  | 48  | 68  |
|            | 21                     |     |     | 38  | 55  |
|            | 20                     |     |     | 41  | 129 |
|            | 26                     |     |     | 57  | 464 |
|            |                        |     |     | 39  | 199 |
|            |                        |     |     | 32  | 62  |
|            |                        |     |     | 88  | 61  |
|            |                        |     |     |     | 209 |
| n          | 10                     | 6   | 13  | 26  | 22  |
| $\bar{x}$  | 26                     | 25  | 37  | 46  | 102 |
| $s\bar{x}$ | 3                      | 4   | 4   | 6   | 20  |
| s          | 10                     | 10  | 16  | 31  | 96  |

Tabelle 5: Anzahl der Zellen in den Enzymdefektbezirken zu verschiedenen Zeitpunkten nach part. Hepatektomie. DÄNA (5mg/kg/Tag) für 15 Tage.

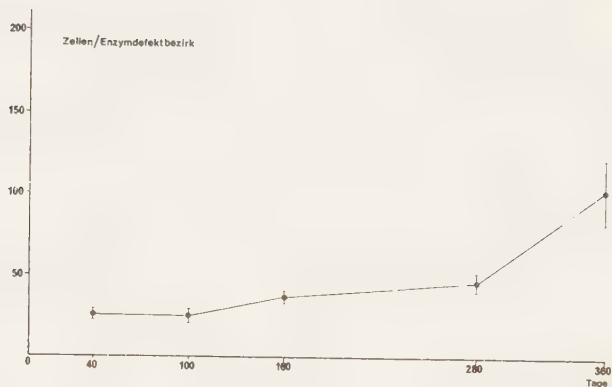


Abb.6: Mittlere Anzahl der Zellen in den Enzymdefektbezirken als Funktion der Zeit nach partieller Hepatektomie. Die Ratten erhielten DÄNA (5mg/kg/Tag) für 15 Tage. Absetzen des DÄNA nach Hepatektomie.

Abszisse: Tage nach Hepatektomie

Ordinate: Anzahl der Zellen in den Enzymdefektbezirken mit mittlerem Fehler des Mittelwerts

Tabelle 6

| Tiere     | Tage nach Hepatektomie |     |     |     |     |     |
|-----------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|           | 10                     | 40  | 70  | 100 | 160 | 280 |
| 1         | 27                     | 62  | 60  |     | 81  | 284 |
|           | 11                     |     | 95  |     | 80  | 60  |
|           |                        |     | 71  |     | 168 | 222 |
|           |                        |     | 26  |     | 107 | 72  |
|           |                        |     | 59  |     | 110 | 56  |
|           |                        |     |     |     | 87  | 73  |
|           |                        |     |     |     | 463 | 138 |
|           |                        |     |     |     | 92  | 103 |
|           |                        |     |     |     |     | 100 |
|           |                        |     |     |     |     | 131 |
|           |                        |     |     |     |     |     |
| 2         | 24                     | 26  | 26  | 50  | 82  | 57  |
|           | 25                     | 116 |     | 52  | 50  | 425 |
|           | 33                     | 41  |     | 72  | 65  | 388 |
|           | 20                     | 45  |     | 72  | 57  | 122 |
|           |                        | 33  |     | 81  | 48  | 326 |
|           |                        |     |     | 39  | 59  | 158 |
|           |                        |     |     | 41  |     |     |
|           |                        |     |     | 22  |     |     |
|           |                        |     |     | 45  |     |     |
|           |                        |     |     | 56  |     |     |
|           |                        |     |     |     |     |     |
| 3         | 66                     | 127 | 93  | 71  | 242 |     |
|           | 38                     | 41  | 163 | 72  | 103 |     |
|           | 55                     | 44  | 79  | 45  | 161 |     |
|           |                        | 151 |     | 39  | 123 |     |
|           |                        |     |     | 54  | 48  |     |
|           |                        |     |     |     | 101 |     |
|           |                        |     |     |     | 138 |     |
|           |                        |     |     |     | 120 |     |
| 4         | 10                     | 39  | 54  | 128 | 57  | 265 |
|           | 12                     | 236 | 57  | 44  | 225 | 136 |
|           | 23                     | 62  | 38  | 63  | 83  | 120 |
|           | 80                     | 26  |     | 56  | 160 | 231 |
|           |                        |     |     | 36  | 78  | 40  |
|           |                        |     |     |     | 53  |     |
|           |                        |     |     |     | 124 |     |
|           |                        |     |     |     | 223 |     |
|           |                        |     |     |     | 70  |     |
|           |                        |     |     |     | 112 |     |
|           |                        |     |     |     |     |     |
| 5         | 16                     | 29  | 66  |     |     |     |
|           |                        | 76  | 104 |     |     |     |
|           |                        | 64  | 24  |     |     |     |
|           |                        | 190 | 45  |     |     |     |
| <hr/>     |                        |     |     |     |     |     |
| n         | 14                     | 18  | 16  | 20  | 33  | 21  |
| $\bar{x}$ | 31                     | 78  | 66  | 56  | 122 | 167 |
| sx        | 5                      | 14  | 9   | 5   | 15  | 24  |
| s         | 22                     | 61  | 36  | 24  | 86  | 113 |

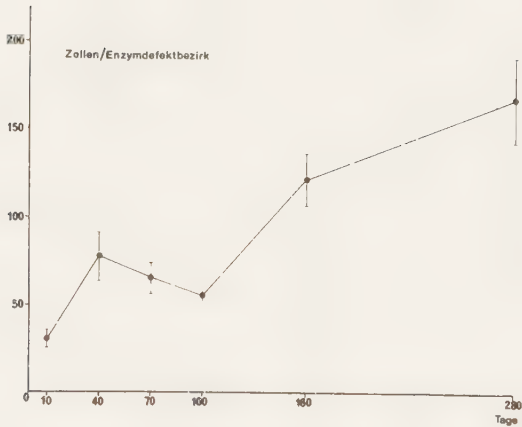


Abb.7: Mittlere Anzahl der Zellen in den Enzymdefektbezirken als Funktion der Zeit nach partieller Hepatektomie. Die Ratten erhielten DÄNA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage. Absetzen des DÄNA nach Hepatektomie.

Abszisse: Tage nach Hepatektomie

Ordinate: Anzahl der Zellen in den Enzymdefektbezirken mit mittlerem Fehler des Mittelwerts

---

Tabelle 6: Anzahl der Zellen in den Enzymdefektbezirken zu verschiedenen Zeitpunkten nach part. Hepatektomie. DÄNA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage.

| Tier       | Tage nach Hepatektomie |     |      |      |      |
|------------|------------------------|-----|------|------|------|
|            | 40                     | 100 | 160  | 280  | 360  |
| 1          |                        |     | 7,4  | 10,2 |      |
|            |                        |     | 6,9  | 10,1 |      |
|            |                        |     | 11,0 | 7,8  |      |
|            |                        |     |      | 10,0 |      |
|            |                        |     |      | 11,0 |      |
| 2          | 0,0                    | 8,0 | 3,7  | 8,1  | 2,9  |
|            | 8,6                    | 0,0 | 0,0  | 5,6  | 5,3  |
|            | 4,0                    |     | 0,0  | 1,8  | 6,8  |
|            |                        |     | 0,0  | 0,0  | 10,1 |
|            |                        |     |      | 3,2  | 12,2 |
|            |                        |     |      | 0,0  | 1,7  |
|            |                        |     |      |      | 9,2  |
| 3          | 7,7                    |     | 4,5  | 8,8  | 5,2  |
|            |                        |     |      | 5,2  | 4,5  |
|            |                        |     |      |      | 6,1  |
|            |                        |     |      |      | 6,2  |
|            |                        |     |      |      | 4,8  |
|            |                        |     |      |      | 8,3  |
| 4          | 0,0                    | 0,0 | 4,5  | 6,8  |      |
|            | 0,0                    | 6,5 | 4,3  | 5,5  |      |
|            |                        | 0,0 | 0,0  | 0,0  |      |
|            |                        | 7,7 | 2,0  | 0,0  |      |
|            |                        |     |      | 11,0 |      |
|            |                        |     |      | 7,5  |      |
| 5          | 12,0                   |     | 0,0  | 8,3  | 1,5  |
|            | 4,8                    |     |      | 7,9  | 1,8  |
|            | 10,0                   |     |      | 4,9  | 3,1  |
|            | 3,8                    |     |      | 3,5  | 1,9  |
|            |                        |     |      | 7,7  | 3,5  |
|            |                        |     |      | 6,2  | 4,8  |
|            |                        |     |      | 4,5  | 1,6  |
|            |                        |     |      |      | 7,2  |
| n          | 10                     | 6   | 13   | 26   | 22   |
| $\bar{x}$  | 5,0                    | 3,7 | 3,4  | 5,9  | 5,2  |
| $s\bar{x}$ | 1,4                    | 1,6 | 0,9  | 0,7  | 0,6  |
| s          | 4,4                    | 3,9 | 3,3  | 3,6  | 2,8  |

Tabelle 7: Prozentsatz der markierten Hepatozyten ( $^3\text{H}$ -TdR-MI) in den Enzymdefektbezirken zu verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie.  
DÄNA (5mg/kg/Tag) für 15 Tage.

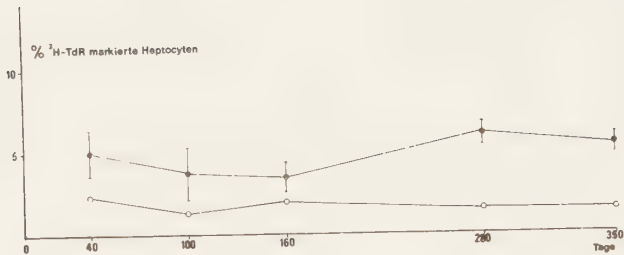


Abb.8: DNS-Syntheseaktivität in den Hepatozyten der Enzymdefektbezirke und des Normalparenchyms als Funktion der Zeit nach part. Hepatektomie. Die Ratten erhielten DÄNA (5mg/kg/Tag für 15 Tage. Absetzen des DÄNA nach Hepatektomie.

Abszisse: Tage nach Hepatektomie

Ordinate:  $^3\text{H-TdR}$ -MI nach 6-maliger Injektion von  $^3\text{H-TdR}$  in 6-stündigen Abständen mit mittlerem Fehler des Mittelwerts

● — ●  $^3\text{H-TdR}$ -MI in den Enzymdefektbezirken

○ — ○  $^3\text{H-TdR}$ -MI im normalen, nicht enzymdefizienten Parenchym

Tabelle 8

| Tier        | Tage nach Hepatektomie |      |      |      |      |      |
|-------------|------------------------|------|------|------|------|------|
|             | 10                     | 40   | 70   | 100  | 160  | 280  |
| 1           | 18,8                   | 3,2  | 8,3  |      | 1,2  | 8,1  |
|             | 0,0                    |      | 8,4  |      | 2,5  | 6,7  |
|             |                        |      | 2,8  |      | 3,0  | 4,5  |
|             |                        |      | 7,7  |      | 3,7  | 7,0  |
|             |                        |      | 18,6 |      | 0,9  | 5,4  |
|             |                        |      |      |      | 2,3  | 5,5  |
|             |                        |      |      |      | 5,4  | 3,6  |
|             |                        |      |      |      | 0,0  | 1,0  |
|             |                        |      |      |      |      | 2,5  |
|             |                        |      |      |      |      | 10,7 |
|             |                        |      |      |      |      |      |
|             |                        |      |      |      |      |      |
|             |                        |      |      |      |      |      |
|             |                        |      |      |      |      |      |
| 2           | 8,4                    | 11,6 | 3,8  | 16,0 | 6,1  | 7,0  |
|             | 8,0                    | 2,6  |      | 21,0 | 12,0 | 6,1  |
|             | 12,0                   | 9,7  |      | 12,4 | 4,6  | 14,6 |
|             | 25,0                   | 4,4  |      | 26,4 | 0,0  | 3,6  |
|             |                        | 3,0  |      | 19,8 | 4,2  | 12,3 |
|             |                        |      |      | 15,4 | 5,1  | 10,7 |
|             |                        |      |      | 19,5 |      | 8,9  |
|             |                        |      |      | 4,5  |      |      |
|             |                        |      |      | 17,8 |      |      |
|             |                        |      |      | 7,2  |      |      |
|             |                        |      |      |      |      |      |
|             |                        |      |      |      |      |      |
| 3           | 27,0                   | 4,8  | 4,3  | 8,4  | 22,7 |      |
|             | 0,0                    | 4,9  | 1,8  | 11,1 | 11,8 |      |
|             |                        | 4,5  | 8,9  | 8,9  | 14,9 |      |
|             |                        | 1,9  | 21,0 | 10,2 | 10,6 |      |
|             |                        |      |      | 5,7  | 8,3  |      |
|             |                        |      |      |      | 17,0 |      |
|             |                        |      |      |      | 11,9 |      |
|             |                        |      |      |      | 11,8 |      |
|             |                        |      |      |      | 11,7 |      |
|             |                        |      |      |      | 17,5 |      |
| 4           | 0,0                    | 2,6  | 7,4  | 4,7  | 10,5 | 7,8  |
|             | 8,3                    | 6,7  | 5,3  | 2,3  | 9,8  | 6,7  |
|             | 4,4                    | 4,8  | 10,5 | 17,4 | 8,4  | 13,2 |
|             | 2,5                    | 7,7  |      | 5,4  | 5,0  | 4,4  |
|             |                        |      |      | 33,4 | 7,7  | 5,0  |
|             |                        |      |      |      | 3,8  | 3,5  |
|             |                        |      |      |      | 12,9 | 2,5  |
|             |                        |      |      |      | 6,7  |      |
|             |                        |      |      |      | 1,4  |      |
|             |                        |      |      |      | 9,8  |      |
| 5           | 18,8                   | 3,4  | 3,1  |      |      |      |
|             |                        | 7,9  | 6,7  |      |      |      |
|             |                        | 6,3  | 8,7  |      |      |      |
|             |                        | 1,6  | 2,2  |      |      |      |
|             |                        |      |      |      |      |      |
| n           | 13                     | 18   | 17   | 20   | 34   | 24   |
| $\bar{x}$   | 10,2                   | 5,0  | 7,6  | 13,3 | 7,7  | 6,7  |
| s $\bar{x}$ | 2,6                    | 0,6  | 1,2  | 1,8  | 0,9  | 0,7  |
| s           | 9,4                    | 2,6  | 4,9  | 8,1  | 5,3  | 3,4  |

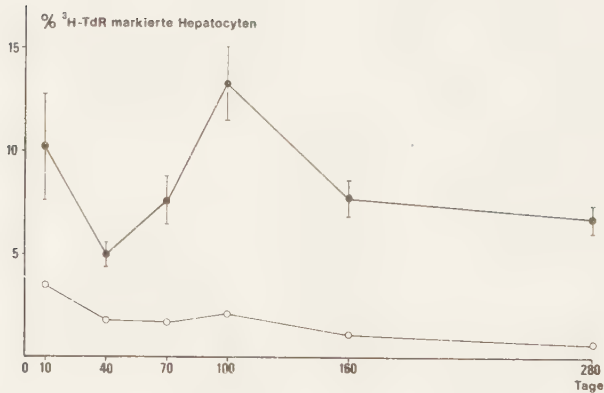


Abb.9: DNS-Syntheseaktivität in den Hepatozyten der Enzymdefektbezirke und des Normalparenchyms als Funktion der Zeit nach part. Hepatektomie. Die Ratten erhielten DÄNA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage. Absetzen des DÄNA nach Hepatektomie.

Abszisse: Tage nach Hepatektomie

Ordinate:  $^3\text{H-TdR}$ -MI nach 6-maliger Injektion von  $^3\text{H-TdR}$  in 6-stündigen Abständen mit mittlerem Fehler des Mittelwerts

●—●  $^3\text{H-TdR}$ -MI in den Enzymdefektbezirken

○—○  $^3\text{H-TdR}$ -MI im normalen, nicht enzymdefizienten Parenchym

---

Tabelle 8: Prozentsatz der markierten Hepatozyten ( $^3\text{H-TdR}$ -MI) in den Enzymdefektbezirken zu verschiedenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie. DÄNA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage.

## 2.3. ÜBERLEBENSZEITEN UND TODESURSACHEN DER VERSUCHSTIERE NACH DÄNA - APPLIKATION UND PARTIELLER HEPATEKTOMIE

Diejenigen Versuchstiere, die bereits wenige Tage nach der Hepatektomie an den Operationsfolgen, etwa einer Pneumonie oder Hämorrhagie starben, wurden für diese Aufstellung nicht berücksichtigt. So standen nach 15-tägiger DÄNA - Fütterung 21 Tiere und nach 30-tägiger Behandlung 19 Tiere für die Auswertung zur Verfügung.

### 2.3.1. Todeszeitpunkt und Befunde nach 15-tägiger DÄNA - Behandlung

Die Überlebenszeit der Tiere, die 15 Tage lang DÄNA in einer Dosierung von 5mg/kg/Tag erhalten hatten, lag zwischen 80 und 877 Tagen nach Hepatektomie, im Durchschnitt überlebten die Tiere die Hepatektomie um 592 Tage (siehe Abb.10).

Makroskopisch zeigten nur zwei Tiere Lebertumoren; als nicht - kanzeröse Veränderung wurden multiple kleinste Leberzystchen gefunden. In einem Fall starb das Tier an Blasensteinen mit Urämie, ein weiteres zeigte ein metastasierendes Plattenepithelkarzinom der Nasenschleimhaut. Die Hälfte der Tiere starb an interkurrenten Infekten der Lunge. In zwei Fällen war eine Sektion wegen Kannibalismus unmöglich, bei einem weiteren Tier war makroskopisch kein pathologischer Befund zu erheben.

Bei der mikroskopischen Auswertung fanden sich in drei Fällen ein cholangioläres Karzinom (Abb.13), ein hepatozelluläres Karzinom (Abb.14) wurde dagegen nur in einem Fall beobachtet.

In der Leber eines dieser Tiere wurden unreife Blutzellen der myeloischen Reihe im Sinne einer leukämoiden Reaktion gefunden. Einige Versuchstiere zeigten in der Leber kleine rundliche, scharf begrenzte helle Zellbezirke (Abb. 15), die als fokale cholangioläre Proliferation zu deuten sein dürften. Bei einem Tier wurden Tubulusadenome der Niere (Abb. 16) gefunden. Außerdem wurden in einigen Präparaten eine gemischttropfige Leberzellverfettung und eine periportale Fibrose festgestellt. Eine Übersicht über die Überlebenszeiten der Tiere sowie über die makroskopischen und mikroskopischen Befunde gibt die folgende Tabelle 9.

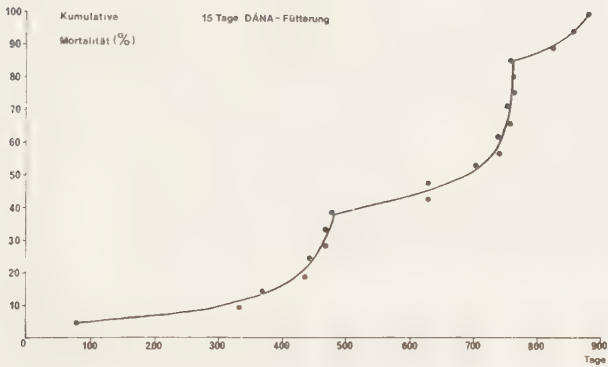


Abb.10: Darstellung der Absterberaten der Kontrolltiere als Funktion der Überlebenszeit nach partieller Hepatektomie. Die Ratten erhielten DANA (5mg/kg/Tag) für 15 Tage. Absetzen des DANA nach Hepatektomie.

Abszisse: Überlebenszeit nach Hepatektomie

Ordinate: Kumulation der Absterberaten der Tiere gegen 100%

| Tage nach<br>Hepatekt. | Tod mit Tumoren od. präneoplast. Veränderungen             | Makroskopie | Histologie                                                                                                                                                                      | andere Befunde bzw. Todesursachen                                               |
|------------------------|------------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 80                     |                                                            |             |                                                                                                                                                                                 | Blasensteine mit abszedierender Entzündung, Harnblasenpapillome, Pyelonephritis |
| 333                    |                                                            |             |                                                                                                                                                                                 | Kannibalismus, keine Sektion                                                    |
| 371                    |                                                            |             |                                                                                                                                                                                 | Splenomegalie, Schockzeichen                                                    |
| 435                    |                                                            |             |                                                                                                                                                                                 | Bronchopneumonie                                                                |
| 445                    |                                                            |             |                                                                                                                                                                                 | Bronchopneumonie, herdförmiges Emphysem                                         |
| 465                    |                                                            |             |                                                                                                                                                                                 | Makrosk. kein pathol. Befund                                                    |
| 470                    |                                                            |             |                                                                                                                                                                                 | Bronchopneumonie                                                                |
| 480                    |                                                            |             |                                                                                                                                                                                 | Kannibalismus, keine Sektion                                                    |
| 626                    |                                                            |             | cholangioläre Prolifera-<br>tion,                                                                                                                                               | Pneumonie; multiple Mikrozysten<br>der Leber                                    |
| 627                    |                                                            |             | cholangioläre Prolifera-<br>tion, Glykogenspei-<br>cherherde                                                                                                                    | abszedierte Pneumonie; Splenomega-<br>lie, Mikrozysten der Leber                |
| 705                    | Mikroblutungen der Le-<br>ber                              |             | hochdifferenziertes<br>cholangioläres Karzi-<br>nom                                                                                                                             | abszedierte Pneumonie, Schockzei-<br>chen, herdförmige Leberzellver-<br>fettung |
| 740                    | Tumor im Oberkieferbe-<br>reich, Tumor am Lun-<br>genhilus |             | Von der Nasenschleim-<br>haut ausgehendes, ge-<br>ring differenziertes,<br>teilweise solide wach-<br>sendes gering verhor-<br>nendes Plattenepithel-<br>karzinom, Lu.-Metastase | Magenschleimhauterosionen                                                       |
| 742                    |                                                            |             |                                                                                                                                                                                 | Bronchopneumonie                                                                |

|     |                                                                       |                                                                                                                                                                                                       |                                                                 |              |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------|
| 756 |                                                                       |                                                                                                                                                                                                       | schwere chronische Bronchitis und Peribronchitis; Schockzeichen |              |
| 757 | Leber von Bindegewebsfasern septiert, beginnender zirrhotischer Umbau | fokale cholangioläre Proliferation, portale Fibrose und Entzündung, Leberzellverfettung                                                                                                               | herdförmige frische Bronchopneumonie; chron. Pyelonephritis     |              |
| 758 |                                                                       |                                                                                                                                                                                                       | eitrige Bronchitis                                              |              |
| 760 |                                                                       |                                                                                                                                                                                                       | Bronchopneumonie; multiple Mikrozysten der Leber                |              |
| 760 |                                                                       | fokale cholangioläre Proliferation                                                                                                                                                                    | Bronchopneumonie; Schockzeichen; Mikroabszesse der Leber        |              |
| 822 | 3 Lebertumoren von ca. 1cm Ø, Lungenmetastase                         | Hepatom; 1Cholangio-<br>karzinom; fokale cholangioläre Proliferation; in der Lunge undifferenzierte Tumormetastase; in Leber u. Lunge unreife Blutzellen der myeloischen Reihe (leukämioide Reaktion) | Schockzeichen; multiple Mikrozysten der Leber                   | 1<br>73<br>1 |
| 855 | Lebertumor von 1cm Ø                                                  | infiltrierendes Cholangiokarzinom                                                                                                                                                                     | Emphysem-lunge mit Oedem                                        |              |
| 877 |                                                                       | Tubulusadenome der Niere                                                                                                                                                                              | Mikroabszesse der Leber; Magen-schleimhauterosionen             |              |

Tabelle 9: Überlebenszeiten der Kontrollgruppe sowie makroskopische und mikroskopische Befunde nach 15-tägiger DANA - Behandlung und Hepatektomie

### 2.3.2. Todeszeitpunkt und Befunde nach 30-tägiger DÄNA - Behandlung

Die mittlere Überlebenszeit der Tiere, die 30 Tage DÄNA erhalten hatten, betrug 446 Tage nach partieller Hepatektomie, wobei die Zeitpunkte des Todes zwischen dem 176. und dem 620. Tag lagen (siehe Abb. 11 und 12).

10 Tiere zeigten bei der Sektion teilweise sehr große Lebertumoren, von denen einige bereits in Lunge, Netz oder Niere metastasiert hatten. Primäre Nierentumoren wurden nicht beobachtet.

Vier Tiere starben an einer Pneumonie. Zwei Tiere waren makroskopisch ohne pathologischen Befund, zwei weitere Tiere konnten wegen Kannibalismus nicht seziiert werden.

Bei der histologischen Untersuchung der Tumoren wurden zwei hepatozelluläre Karzinome und ein cholangioläres Karzinom gefunden; zwei im Netz liegende Metastasen erwiesen sich als Adenokarzinom bzw. Hämangioendotheliom. Auch nach 30-tägiger Behandlung fanden sich einige der Bezirke mit cholangiolärer Proliferation. Die Leberzellverfettung und die periportale Fibrose waren im allgemeinen etwas stärker ausgeprägt als bei den Tieren, die nur 15 Tage DÄNA erhalten hatten.

In Tabelle 10 sind die Überlebenszeiten der Tiere sowie die zugehörigen makroskopischen und mikroskopischen Befunde aufgeführt.

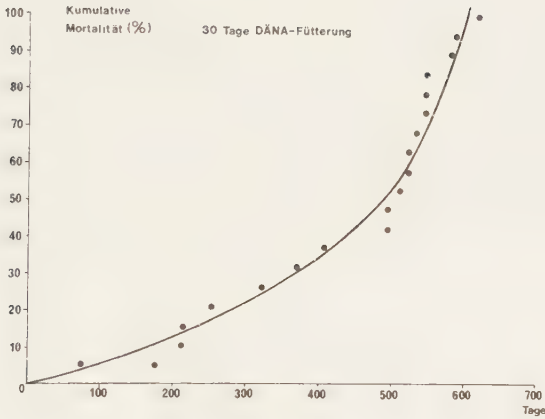


Abb.11: Darstellung der Absterberaten der Kontrolltiere als Funktion der Überlebenszeit nach partieller Hepatektomie. Die Ratten erhielten DANA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage. Absetzen des DANA nach Hepatektomie

Abszisse: Überlebenszeit nach Hepatektomie  
Ordinate: Kumulation der Absterberaten der Tiere gegen 100%

| Tage nach<br>Hepatekt. | Makroskopie                                                                                               | Histologie                                     | andere Befunde bzw. Todesursachen                  |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 176                    | großer Tumor am lobus<br>dexter lat. der Leber                                                            | Hepatom bzw. hyperpla-<br>stischer Knoten      | konfluierende eitrige Bronchitis;<br>Schockzeichen |
| 210                    |                                                                                                           |                                                | Pleuraempyem                                       |
| 212                    | Verdacht auf Lungenme-<br>tastase eines unbekann-<br>ten Primärtumors                                     |                                                | Tier stark autolytisch                             |
| 254                    |                                                                                                           |                                                | Bronchopneumonie                                   |
| 330                    |                                                                                                           |                                                | makroskopisch kein pathol. Befund                  |
| 369                    |                                                                                                           |                                                | Kannibalismus; keine Sektion                       |
| 408                    |                                                                                                           |                                                | makroskopisch kein pathol. Befund                  |
| 494                    | vom rechten Hoden aus-<br>gehender stark auto-<br>lytischer Tumor                                         |                                                |                                                    |
| 494                    | großer stark autolyti-<br>scher Lebertumor, zwei<br>Metastasen im Netz                                    |                                                |                                                    |
| 512                    |                                                                                                           |                                                | Kannibalismus; keine Sektion                       |
| 520                    | Verblutung aus Tumor<br>am proc. papillaris<br>der Leber; kleinere Tu-<br>moren in aller Leber-<br>lappen | Hepatozelluläres Kar-<br>zinom mit Einblutung  |                                                    |
| 523                    | multiple Lebertumoren,<br>Metastasen in Netz und<br>Mesenterium; Metastase<br>re. Niere                   | Hämangioendotheliom,<br>ins Netz infiltrierend |                                                    |

|     |                                                                       |                                                                                               |                                                                   |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 535 | kleiner Tumor am lobus dexter lat. der Leber                          | Cholangiokarzinom; fokale cholangioläre Proliferation                                         | eitrige Bronchitis                                                |
| 546 | Hämorrhagie aus Lebertumor                                            |                                                                                               | Schockzeichen                                                     |
| 546 | Reste von autolytischem Lebertumor                                    |                                                                                               | Bronchopneumonie; frische Nierenbeckenblutung                     |
| 585 | Verblutung aus großem Tumor im Netzbereich; mult. kleine Lebertumoren | Netz-tumor: mäßig differenziertes Adenokarzinom, vermutlich Metastase aus Lebertumor          | Verfettung und periportale Entzündung der Leber                   |
| 588 | multiple Lebertumoren                                                 | noduläre Hyperplasie mit herdförmiger Glykogenspeicherung                                     | Lungenabszeß                                                      |
| 620 | multiple Lebertumoren, Lungenmetastase                                | hepatozelluläres Karzinom; Karzinommetastase in der Lunge; fokale cholangioläre Proliferation | ausgedehnte Nekrosen und Entzündung der Leber; eitrige Bronchitis |

Tabelle 10: Überlebenszeiten der Kontrollgruppe sowie makroskopische und mikroskopische Befunde nach 30-tägiger DÄNA - Behandlung und Hepatektomie

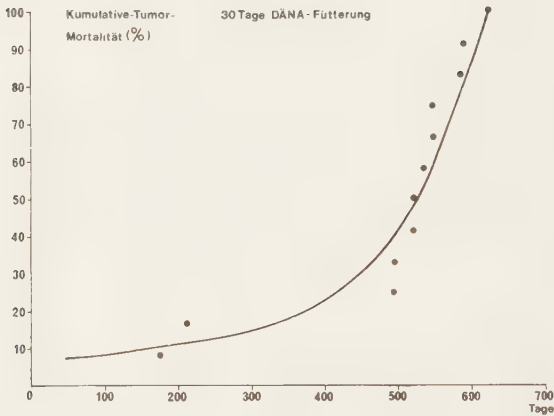


Abb.12: Absterberaten der tumortragenden Kontrolltiere als Funktion der Überlebensdauer nach partieller Hepatektomie. Die Ratten erhielten DÄNA (5mg/kg/Tag) für 30 Tage. Absetzen des DÄNA nach Hepatektomie.

Abszisse: Überlebenszeit nach Hepatektomie

Ordinate: Kumulation der Absterberaten der Tumortiere gegen 100%

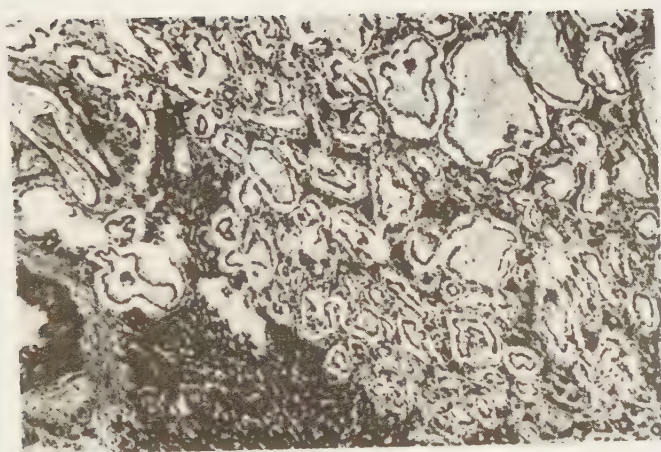


Abb.13: Cholangioläres Karzinom (Vergr. x80)

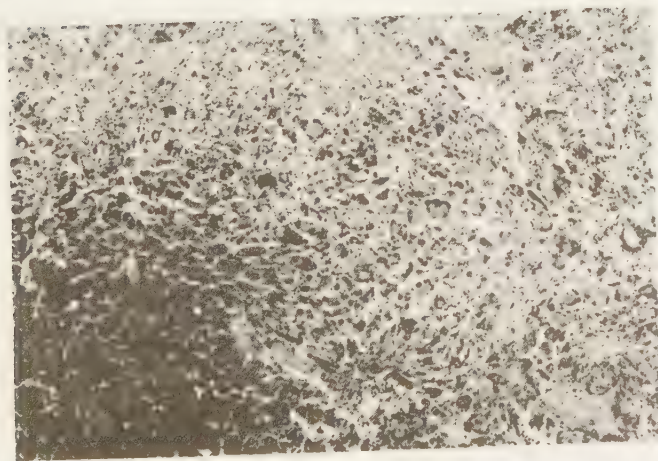


Abb.14: Hepatozelluläres Karzinom (Vergr. x80)

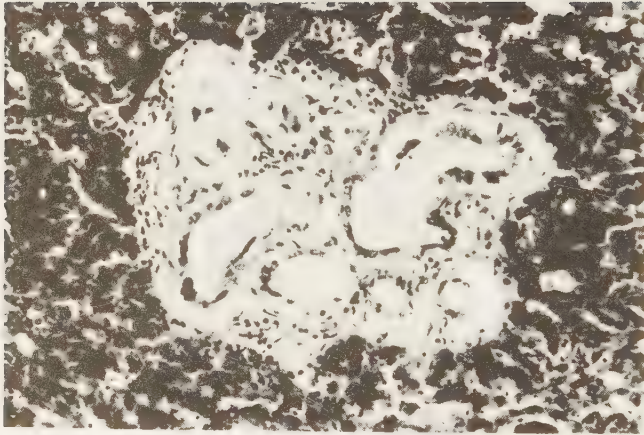


Abb.15: Fokale cholangioläre Proliferation  
(Vergr. x200)

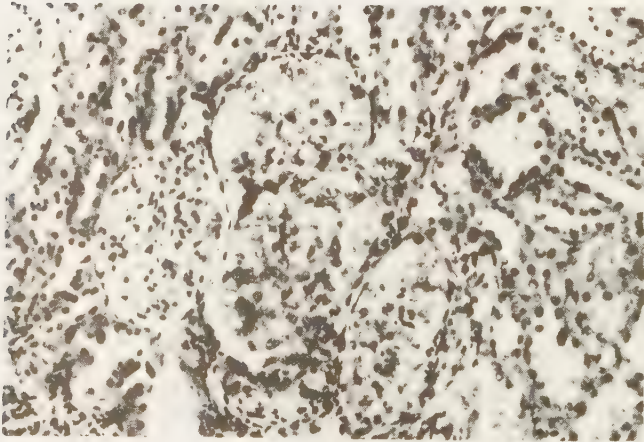


Abb.16: Tubulusadenom der Niere (Vergr. x200)

### 3. DISKUSSION

#### 3.1. DISKUSSION DER AUTORADIOGRAPHISCHEN UND ENZYMHISTOCHEMISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Die Untersuchungen über Korrelationen zwischen Leberzellproliferation und Kanzerogenese sollen unter methodischen und biologischen Aspekten diskutiert werden, da die Relevanz der Ergebnisse und ihre Deutung von einer reproduzierbaren Methode abhängig ist.

##### 3.1.1. Vorteile einer mehrfachen Markierung mit $^3\text{H}$ -Thymidin

Um die Proliferationsaktivität in den durch DÄNA - Gabe hervorgerufenen Enzymdefektbezirken beurteilen zu können, wurde eine Markierung der DNS - synthetisierenden Zellen mit  $^3\text{H}$ -TdR durchgeführt. Nach Inkorporation der markierten Nukleinsäure konnten diese Zellen nach Aufbringen eines Strippingfilmes leicht identifiziert werden.

In den beschriebenen Versuchen wurden einer Pulsmarkierung, also einer einmaligen  $^3\text{H}$ -TdR - Injektion wiederholte Einzelinjektionen vorgezogen. Ist das Intervall zwischen den Injektionen kürzer als die DNS - Syntheszeit  $t_s$ , so werden im Autoradiogramm alle Zellen als markiert erfaßt, die zwischen erster und letzter Thymidininjektion in die DNS - Synthesephase eingetreten sind bzw. sie durchlaufen haben. Nach dieser Markierungsmethode erhält man denselben  $^3\text{H}$ -TdR-MI wie nach einer  $^3\text{H}$ -Thymidindauer-

infusion von gleicher radioaktiver Versuchszeit. Ein so gewonnener  $^3\text{H}$ -TdR-MI gibt eine ungefähre Vorstellung über das Verhalten der Wachstumsfraktion (Mendelsohn 1962a,b) während der DÄNA - Kanzerogenese. Für die regenerierende Leber wurde ein  $t_c$  von 33 Stunden bestimmt (Rabes et al. 1972), demnach würden sich bei der hier gewählten radioaktiven Versuchszeit von 31 Stunden alle proliferierenden Zellen einmal in der DNS - Synthesephase befinden. 10 - 18 Tage nach Hepatektomie hat die Leber jedoch wieder ihre ursprüngliche Masse erreicht (Harkness 1957, Weinbren 1959, Pack et al. 1962) und die relative Häufigkeit der S - Phasen - Zellen kehrt wieder zum Normalwert zurück (Fabrikant 1968). Gleichzeitig übersteigt die längere Zellzykluszeit der ruhenden Leber die radioaktive Versuchszeit um ein Vielfaches, so daß durch eine 31-stündige Dauerapplikation von  $^3\text{H}$ -Thymidin nur noch ein Teil der Wachstumsfraktion erfaßt werden kann. Nach Scholze (1972) bringt in der ruhenden Leber eine solche mehrmalige Markierung gegenüber einer Pulsmarkierung lediglich einen um den Faktor 3 erhöhten Markierungsindex. Als Nebenwirkung des Thymidins kann es dabei durch die wiederholte Anwendung verstärkt zu Teilsynchronisation und Mitosehemmung kommen (Grisham 1960).

Da bei der hier gewählten Versuchsanordnung der erste radioaktive Versuch am 10. Tag nach Hepatektomie durchgeführt wurde und die weiteren zwischen dem 40. und 360. Tag lagen, entsprechen die ermittelten Markierungsindices denen einer ruhenden Leber. Die um das 3-fache erhöhte Markierungsdichte bei mehrmaliger Injektion könnte jedoch, besonders bei der Bestimmung der Indices kleiner Zellbezirke, zur Erhöhung der Meßgenauigkeit beitragen.

### 3.1.2. Zur Auswertung der Markierungsindices der Enzymdefektbezirke

Da die DÄNA - Fütterung nur für sehr kurze Zeit durchgeführt wurde, standen besonders in den ersten radioaktiven Versuchen lediglich sehr kleine Enzymdefektbezirke für die Auswertung zur Verfügung. Abgesehen von den Schwierigkeiten, jene kleinen Zellinseln mit den entsprechenden Autoradiographie - Präparaten im Maskenvergleichsmikroskop genau zur Deckung zu bringen, erscheint es notwendig, die Aussagekraft der daraus ermittelten Markierungsindices mit Vorbehalt zu beurteilen. Enthielt z.B. ein Bezirk von 20 enzymdefizienten Zellen 2 markierte Zellen, so entspricht das bereits einem Markierungsindex von 10%, obwohl diese Zellen sich nicht wesentlich von der "Background" - Markierung des normalen Parenchyms abhoben. Teilweise waren im umgebenden Parenchym sogar dichtere Ansammlungen von markierten Zellen zu beobachten, die sich jedoch mit keinem Enzymdefektbezirk zur Deckung bringen ließen. Andererseits enthielten größere EDB oft keine einzige markierte Zelle, trotz sorgfältigster Prüfung der Übereinstimmung. Im Durchschnitt liegt der Markierungsindex in den Defektbezirken jedoch um ein mehrfaches über dem des normalen Parenchyms.

Waren in einem EDB mehrere markierte Zellen vorhanden, so waren diese oft nicht über den ganzen Bereich verteilt, sondern lagen in Nestern nahe zusammen. Es muß daran gedacht werden, daß sich innerhalb der EDB clonal wachsende Subpopulationen abgrenzen, die die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellinseln bestimmen. Die Heterogenität der Defektbezirke im enzymhistochemischen Präparat bei Dauerfütterung von DÄNA ist bekannt (Rabes et al. 1972, Friedrich-

Freksa et al. 1969). Die von Scholze (1972) beschriebene geringere Silberkorndichte konnte in den hier durchgeführten Versuchen nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine Auszählung der Silberkörner verzichtet.

### 3.1.3. Zur Streubreite der EDB - Markierungen

Wie bereits erwähnt und aus den hohen Standardabweichungen ersichtlich, bestehen zwischen den Markierungsindices der einzelnen EDB einer Versuchsgruppe große Gegensätze. Die ermittelten Werte entsprechen einerseits einem nicht proliferierenden, stabilen Gewebe und ahmen andererseits im Extremfall das autonome Wachstum malignen Gewebes nach. Läßt man solche außerhalb des Normbereichs liegende Extreme außer acht, so kann man immer noch zwischen langsamer und schneller proliferierenden Enzymdefektbezirken unterscheiden. Diese Beobachtung wäre gut vereinbar mit den Versuchsergebnissen von Scholze (1972), der ein zeitlich gegeneinander verzögertes Ausscheren einzelner EDB aus dem Wachstumsverhalten der Gesamtleber beschreibt, das schließlich in die autonome Proliferation aller EDB übergeht. Dieses autonome Wachstum wurde in den vorliegenden Versuchen nicht erreicht, da die Leberzellen durch die geringe Kanzerogenmenge vermutlich zu wenig geschädigt und zu wenig zur endogenen Proliferation stimuliert worden waren. Denkbar wäre auch, daß die Versuchsdauer zu kurz gewählt wäre, wogegen jedoch ein Absinken der Kurven für die Markierungsindices gegen Ende der Versuchszeit spricht. Möglicherweise wäre es sinnvoll, aus der großen Streubreite der EDB - Markierungen einzelne Gruppen von Enzymdefekten mit gerin-

gerer Streuung zusammenzufassen und in langsam, mittelschnell und schnell proliferierende Populationen zu unterscheiden. Wo jedoch diese Trennungslinien gezogen werden sollten, ist ein mathematisches Problem, auf das hier nicht weiter eingegangen werden kann.

#### 3.1.4. Diskussion des Kurvenverlaufs der EDB - Markierungen

##### a) 15 Tage DÄNA - Fütterung

Bei den 15 Tage mit DÄNA behandelten und anschließend hepatektomierten Ratten wurde der erste radioaktive Versuch am 40. Tag nach der Operation durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt waren auf den ATPase - Präparaten von 5 Tieren lediglich 6 Enzymdefektbezirke vorhanden, deren durchschnittlicher Markierungsindex von 7,2% statistisch nicht gesichert werden kann. Gleichzeitig war aber auch die "Background" - Markierung des normalen, nicht enzymdefizienten Leberparenchyms gegenüber späteren Versuchen noch etwas erhöht. Obwohl am 40. Tag die Leberregeneration bereits abgeschlossen sein müßte, wäre es denkbar, daß der erhöhte Wert für EDB - und Parenchymmarkierung auf das Ende einer durch die DÄNA - Gabe stark verzögerten DNS - Synthesewelle zurückzuführen ist. Angaben über die Hemmung der DNS - Synthesewelle nach partieller Hepatektomie infolge Kanzerogengabe sprechen für diese Hypothese (Rabes 1970, Craddock 1975). Eine weitere Bestätigung ist darin zu sehen, daß sich in allen Enzymdefektbezirken markierte Zellen finden. Zum 100. Tag hin fiel der Markierungsindex in EDB und Parenchym auf die Hälfte ab, manche EDB enthielten keine Markierungen. Unter Vermehrung der Enzymdefektbezirke

hielt der Abfall ihrer Markierungen noch bis zum 160. Tag an. Für den 280. Tag konnte wieder ein höherer Markierungsindex errechnet werden, der bis zum 360. Tag nahezu konstant blieb. Zum letztgenannten Zeitpunkt waren erstmals wieder alle Defektbezirke markiert. Möglicherweise sind bis dahin die nicht mehr oder nur gering proliferierenden EDB durch den ständigen physiologischen Zellverlust zugrunde gegangen, so daß sich nur die im Wachstum befindlichen Enzymdefekte im Parenchym behaupten konnten. Wie bereits erwähnt, gibt es aber keinen sicheren Anhaltspunkt dafür, daß die Enzymdefekte einem endogenen, malignen Wachstum zustreben; sie zeigen lediglich eine gegenüber der normalen Leber erhöhte basale Proliferationsaktivität.

Eine genauere Beurteilung des Wachstumsverhaltens wäre aber nur durch die Bestimmung der induzierbaren Proliferationsaktivität durch eine zweite Hepatektomie möglich. Es scheint jedoch, daß die applizierte DÄNA - Gesamtdosis mit zusätzlichem Proliferationsreiz für die Induktion von autonom wachsenden Tumoren nicht ausreicht.

#### b) 30 Tage DÄNA - Fütterung

Der erste radioaktive Versuch wurde bei den 30 Tage mit DÄNA gefütterten Tieren 10 Tage nach Hepatektomie durchgeführt. Hier waren sowohl bei EDB - als auch Parenchymmarkierung noch deutliche Auswirkungen der auslaufenden DNS - Synthesewelle zu beobachten. Die Streubreite der EDB - Markierungen war dabei jedoch außerordentlich groß und durch die geringe Zahl von Defektbezirken ist eine quantitative Beurteilung nicht möglich.

Im weiteren Verlauf ähnelt die Kurve in etwa derjenigen nach 15 Tagen DÄNA - Fütterung, die man sich in der Abszisse "zusam-

mengeschoben" und in der Ordinate "auseinandergezogen" vorstellen müßte. Dies spräche dafür, daß nach 30 Tagen DÄNA ähnliche Gesetzmäßigkeiten im Proliferationsverhalten wie nach 15 Tagen ablaufen, jedoch in kürzerer Zeit und mit verstärkter Intensität.

Zum Ende der Versuchszeit nach 280 Tagen sind auch hier keine Anzeichen für ein beginnendes endogenes Wachstum zu erkennen; die Kurven für die Markierungsindices der EDB und des Normalparenchyms verlaufen während der gesamten Versuchsdauer andeutungsweise parallel.

Bei Untersuchungen nach Dauerfütterung mit 4mg DÄNA/kg/Tag fanden Schauer und Kunze (1968) hiermit übereinstimmend in manchen, wenn auch nicht in allen EDB einen gegenüber dem normalen Parenchym um den Faktor 2,7 bis 7,3 erhöhten Markierungsindex, der sich während der Kanzerisierung nur geringfügig änderte. Allerdings führte die wesentlich höhere DÄNA - Gesamtdosis nach dem 170. Tag zum Auftreten von Karzinomen, die sich naturgemäß durch eine stärkere Markierung hervorhoben.

Ebenfalls nach DÄNA - Dauerfütterung fanden Rabes et al. (1970, 1972) in den EDB der ruhenden Leber einen gegenüber der Umgebung kaum erhöhten Markierungsindex zwischen dem 30. und 80. Tag der Kanzerogenese. Dies muß den oben erwähnten Ergebnissen von Schauer und Kunze nicht widersprechen, da jene sich auf den Zeitraum nach dem 82. Tag beziehen, wo auch Rabes et al. erhöhte Markierungsindices fanden.

In den hier durchgeführten Versuchen ist jedoch der Markierungsindex in den Defektbezirken schon von Beginn an gegenüber dem normalen Parenchym erhöht. Möglicherweise hängt dies mit der von

Rabes et al. (1970) beschriebenen erhöhten induzierbaren Proliferationsaktivität der EDB in frühen Stadien der Kanzerogenese zusammen, die sich nach Abklingen der DNS - Synthesewellen des normalen Parenchyms in einer erhöhten basalen Proliferationsaktivität fortsetzt.

### 3.1.5. Wachstum der Enzymdefektbezirke

Ein besserer Pauschalwert für die Wachstumsaktivität der Enzymdefektbezirke, allerdings ohne cytologische Zuordnungsmöglichkeit der "proliferierenden Clonen", ist ihre Größenzunahme, die man sowohl anhand ihrer Fläche als auch der darin enthaltenen Anzahl von Zellen messen kann. Bei den 15 Tage lang DÄNA - gefütterten Tieren nahm die durchschnittliche Zellzahl der EDB zwischen dem 40. und 280. Tag nach Hepatektomie langsam von 26 auf 46 Zellen zu. Während dieser Zeit war das Flächenwachstum vorübergehend etwas stärker ausgeprägt (vgl. Abb. 4 und 5), was auf eine Vergrößerung der Einzelzellen schließen läßt. Diese könnten durch ein funktionelles Oedem oder die von Grundmann und Sieburg (1962) beschriebene "Wasservergiftung" des Cytoplasmas verursacht sein. Eine einfachere Erklärung wäre die, daß solche Zellen, die bei der Herstellung der Kryostatschnitt - Präparate verloren gingen, bei der Auswertung nicht erfaßt wurden. Allerdings müßte ein solcher Zellverlust bei allen Präparaten mit gleicher Wahrscheinlichkeit angenommen werden.

Vom 280. bis 360. Tag nach Hepatektomie ist ein für Zellzahl und Fläche vollkommen paralleler steiler Anstieg der Kurven zu verzeichnen. Die mittlere Größe der Enzymdefektbezirke liegt zu die-

sem Zeitpunkt mit  $100\,000\,\mu\text{m}^2 = 0,1\text{mm}^2$  jedoch immer noch unterhalb dem mit bloßem Auge sichtbaren Bereich.

Auch nach 30 Tagen DÄNA - Behandlung verlaufen die Kurven für die Größe der EDB und die Anzahl der enthaltenen Zellen anfangs nicht vollkommen parallel. Einem anfänglichen Anstieg folgt ein kurzzeitiger, geringerer Abfall, der aber am 100. Tag nach Hepatektomie beendet ist. Von da an steigen die Kurvenverläufe zum 160. Tag hin gleichmäßig stark an, um sich bis zum 280. Tag wieder vollkommen zu trennen (vgl. Abb.6 und 7). Einem nur geringfügigen Anwachsen der Zellzahl steht hierbei eine weiterhin sehr starke Vergrößerung der Flächen gegenüber. Erklärbar wäre diese Beobachtung mit einer der malignen Transformation häufig vorausgehenden endomitotischen Polyploidisierung der Zellkerne. In der Tat konnten manche Enzymdefektbezirke mit riesig aufgetriebenen, in großem Abstand liegenden Zellkernen beobachtet werden (Abb.17 und 18), die anstelle der durchschnittlich gefundenen Zelldichte von 1000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  nur wenige Hundert aufwiesen. Für diese Zusammenstellung wurden die in einigen Präparaten gefundenen, bereits makroskopisch sichtbaren Mikrokarzinome außer acht gelassen, da für sie jeweils nur 1000 Zellen ausgezählt worden waren und teilweise auch schon zentrale Nekrosen vorhanden waren. Außerdem hätte das stark beschleunigte Wachstum dieser Tumoren eine Beurteilung des Wachstumsverhaltens der "normal" proliferierenden Defektbezirke unmöglich gemacht.

Bemerkenswert ist die Beobachtung, daß beim Vergleich der Kurven für die Markierungsindices und das Größenwachstum der Enzymdefektbezirke sowohl bei den 15 als auch 30 Tage mit DÄNA gefüt-

terten Tieren immer ein Anstieg des Markierungsindex vorausgeht, der beim nächsten Versuchszeitpunkt in einer stärkeren Vergrößerung der EDB seinen Ausdruck findet. Liegt der Markierungsindex dagegen niedrig, so ist auch der Größenzuwachs der EDB bis zum nächsten Versuchstermin nur gering.

Ein anderes als das hier beschriebene Wachstumsverhalten der Enzymdefektbezirke fanden Scherer et al. (1972) bei einer einzigen Gabe von 10 - 20mg DÄNA/kg 24 Stunden nach einer 2/3 - Hepatektomie. Hier stieg die Größe der EDB nur bis zum 229. Versuchstag an, wobei zwei Wachstumsphasen unterschieden werden konnten: Bis zur 6. Woche war der Größenzuwachs rapide, während er bis zum Ende des Experiments nach 8 Monaten immer langsamer wurde. Die Autoren führen dies auf ein Einsetzen von immunologischen Mechanismen zurück, die einem weiteren Anwachsen der enzymdefizienten Zellpopulationen entgegentreten. Trotzdem fanden auch sie eine gewisse Wachstumsautonomie der Defektbezirke, die sich in einer gegenüber dem normalen Parenchym stark verkürzten Populations - Verdopplungszeit ausdrückte.

In Untersuchungen von Friedrich - Freksa et al. (1969) ähnelt der Kurvenverlauf für die Größe der EDB mehr demjenigen, der in den hier vorliegenden Versuchen gefunden wurde. Bei einer 56 Tage dauernden DÄNA - Behandlung von 8mg/kg/Tag folgte einem zwischen der 4. und 9. Woche nach Absetzen des DÄNA andauernden langsamen Flächenwachstum eine rapide Vergrößerung mit Erhöhung der Mitosehäufigkeit. Dem langsamen Wachstum könnte aber schon während der DÄNA - Fütterung ein in dieser Versuchsanordnung nicht erfaßter schnellerer Anstieg vorangegangen sein. Für die Verlangsamung des Wachstums der EDB zwischen der 4. und

9. Woche soll ebenfalls eine Immunreaktion verantwortlich sein, die vom Organismus gegen die neu aufgetretenen Oberflächenantigene aufgebaut wird. Der zweite Anstieg könnte bei der dabei angewendeten hohen Gesamtdosis nämlich schon die maligne Transformation andeuten, da nach 112 Tagen bereits die ersten Mikrokarzino-  
me gefunden wurden.

#### 3.1.6. Wachstumskinetik der Enzymdefektbezirke

Unter Wachstumskinetik wird hier eine Gesetzmäßigkeit verstanden, nach der die Enzymdefektbezirke in zunehmendem Maße das Leberparenchym befallen. Nicht gemeint ist in diesem Fall die Proliferationskinetik der Hepatozyten in den EDB. Von Interesse ist die Frage, ob die ständig zunehmende Anzahl der EDB je Flächeneinheit allein dem Wachstum der schon in frühen Stadien angelegten und noch nicht auswertbaren enzymdefizienten Zellinseln zuzuschreiben ist, oder ob während der Karzinogenese ständig neue Defektbezirke entstehen.

Bei den 15 Tage mit DÄNA gefütterten Tieren ist zwischen dem 40. und 100. Tag nach Hepatektomie noch kein Anstieg, sondern ein geringer Rückgang der Anzahl der EDB pro Quadratzentimeter Schnittfläche zu beobachten. Daran schließt sich eine bis zum Versuchsende am 360. Tag anhaltende, nahezu lineare Zunahme an.

Im Gegensatz dazu erfolgt bei den 30 Tage mit DÄNA behandelten Tieren schon vom ersten Versuch am 10. Tag nach Hepatektomie bis zum 100. Tag ein linearer Anstieg, der sich jedoch bis zum 160. und 280. Tag hin etwas abflacht. Hätte man zu noch späteren Zeitpunkten nach Hepatektomie weitere Versuche durchgeführt, würde

sich die Anzahl der EDB wohl einem konstanten Wert nähern. Auch Scherer et al. (1972) fanden in ihren Versuchen mit einer einzigen DÄNA - Gabe und gleichzeitiger Hepatektomie zuerst einen linearen Anstieg und ab der 6. Woche einen konstanten Wert für die Anzahl der Defektbezirke. Dabei war jedoch die Dosis weitaus geringer als die im hier durchgeführten Versuch angewandte, so daß wohl nicht mehr genügend initiierte Zellen zur Verfügung standen, um noch über längere Zeit neue Enzymdefektbezirke erscheinen zu lassen.

Bei kontinuierlicher DÄNA - Fütterung von 5mg/kg/Tag dagegen zeigt die Anzahl der EDB zwischen dem ersten Auftreten am 30. Tag und dem 80. Tag eine exponentielle Zunahme, die sich aber zwischen dem 80. und 120. Tag in eine leichte Abnahme fortsetzt (Rabes et al. 1972). Der hierfür verantwortliche Mechanismus der Konfluktion der Defektbezirke und Verringerung des Anteils an normalem Parenchym, in dem neue EDB auftreten könnten, kann jedoch nicht auf die hier ermittelten Ergebnisse nach 30-tägiger DÄNA - Fütterung mit Hepatektomie übertragen werden, da der Anteil der Enzymdefekte am Gesamtparenchym auch zu Versuchsende noch äußerst gering war. Vielmehr erscheint es möglich, daß immer weniger während der Kanzerogenapplikation initiierte Zellen für die Entstehung neuer Defektbezirke zur Verfügung stehen. In der Tat wurden vor allem zu frühen Versuchsterminen im gesamten Parenchym verteilt winzige Bezirke von 2 - 5 enzymdefekten Zellen beobachtet, die bei der kombiniert autoradiographisch - enzymhistochemischen Auswertung nicht berücksichtigt werden konnten.

Die andere Möglichkeit, daß sich immer mehr normale Zellen in

Enzymdefektzellen und später in enzymdefiziente Zellinseln umwandeln, erscheint aufgrund dieser Beobachtung und auch in Anbetracht des Mechanismus der Entstehung von Enzymausfällen (siehe allgemeiner Teil) als unwahrscheinlich, vor allem da die DÄNA - Fütterung sehr lange zurückliegt.

Erstaunlich ist nur, daß nach 15-tägiger DÄNA - Applikation die Zunahme der EDB auch noch am 360. Versuchstag anhält. Vielleicht bedingt die auch in den ausgebildeten EDB zu beobachtende niedrigere Proliferationsaktivität, daß sich die erwähnten "Mikro - Bezirke" auch in langsamerer Folge zu sichtbaren Enzymdefekten entwickeln.

Da bisher kaum Kontrollversuche an nicht hepatektomierten Tieren mit gleicher Fütterungsdauer durchgeführt wurden, ist es schwierig, den Einfluß der Hepatektomie auf die Anzahl der Defektbezirke abzuschätzen. Lediglich Rabes und Zettler (1974) fanden bei Absetzen der DÄNA - Fütterung nach 30 Tagen ohne Hepatektomie eine zeitlich begrenzte Zunahme der EDB mit einer daran anschließenden Abnahme, wobei die persistierenden Defektbezirke zuerst ein langsames und nach einer Latenzperiode von 120 Tagen beschleunigtes Wachstum zeigten. Einen weiteren Anhaltspunkt gibt die Beobachtung von Scherer et al. (1972), daß eine 2/3 - Hepatektomie vor einer einmaligen DÄNA - Gabe die Anzahl der EDB auf das 10-fache erhöht.

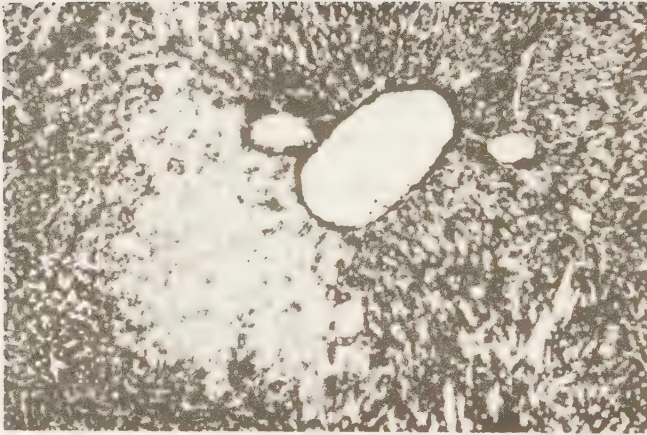


Abb.17: Enzymdefektbezirk im ATPase - Präparat

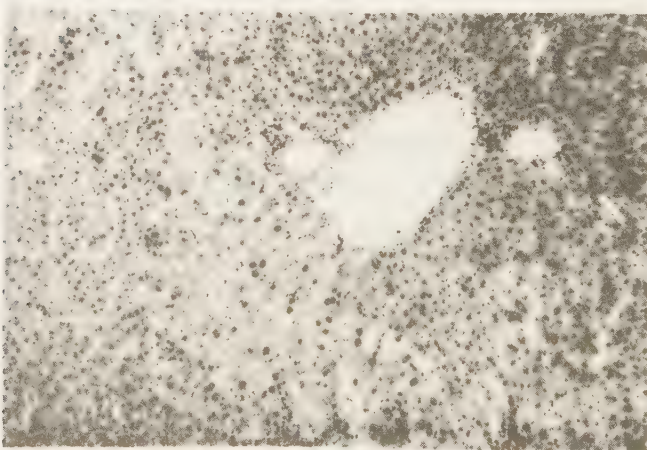


Abb.18: Gleicher EDB im Autoradiogramm; auffallend niedrige Zelldichte mit großen Zellen und Zellkernen

## 3.2. DISKUSSION DER ÜBERLEBENSZEIT UND DER TUMORENTWICKLUNG BEI DER KONTROLLGRUPPE

### 3.2.1. Überlebenszeit der Tiere

#### a) 15 Tage DÄNA - Fütterung

Für die 15 Tage mit DÄNA behandelten Tiere konnte eine mittlere Überlebensdauer von 592 Tagen nach Hepatektomie errechnet werden. Da aber auch hier keine Vergleichswerte für nicht hepatektomier- te Tiere existieren, ist es schwer zu beurteilen, ob durch die DÄNA - Fütterung oder durch die Hepatektomie eine Verkürzung der Überlebenszeit verursacht wurde.

Daß bei DÄNA - Dauerfütterung eine Hepatektomie nach den ersten zwei Wochen wirksamer als nach 3 oder 4 Wochen ist, bewies Hoffmann (1970) in Versuchen mit Resektion eines Drittels der Leber. Ob dies auch zutrifft, wenn die DÄNA - Behandlung nach der Hepat- ektomie abgesetzt wird, ist nicht bekannt; es ist jedoch durchaus möglich, daß eine Operation nach 15-tägiger DÄNA - Fütterung die Lebenszeit stärker verkürzt als nach 30-tägiger Behandlung.

Bis auf zwei Fälle wurde die Überlebenszeit jedoch nicht durch das Auftreten von Tumoren begrenzt, sondern durch andere Ursa- chen, an erster Stelle interkurrente Infekte der Atemwege. In vielen Fällen gab es zwar pathologische mikroskopische und ma- kroskopische Befunde, jedoch konnten keine eindeutigen Todesursa- chen festgestellt werden. Die histologischen Befunde von Schock- niere oder Leberstauung dürften als Zeichen einer finalen Herz- insuffizienz zu werten sein.

Da jedoch die DÄNA - Behandlung in Kombination mit der Teilent-

fernung eines lebenswichtigen Organs einen nicht unbedeutenden Eingriff in die Stoffwechselfunktionen der Versuchstiere darstellt, könnte dieses Trauma auch über weniger spezifische Mechanismen zu einer Lebensverkürzung führen. Bemerkenswerterweise hatten dabei die beiden einzigen Tiere, die bei der Sektion Lebertumoren aufwiesen, die längste Überlebenszeit. Zwischen applizierter Dosis und Latenzzeit bis zum Auftreten von Tumoren besteht eine direkte Korrelation (Druckrey 1967). Es könnte vermutet werden, daß nur bei Tieren ohne interkurrente Infekte die bei der applizierten DÄNA - Dosis für die Tumorentstehung erforderliche Latenzzeit erreicht wird, während die übrigen Tiere ihren Tumor "nicht mehr erleben".

Weiterhin ist der Kurvenverlauf für die Absterberaten der Tiere zu erwähnen. Zwischen dem 400. und 500. Tag nach Hepatektomie und noch stärker um den 750. Tag ist eine Häufung der Todesfälle zu beobachten, während zwischen dem 500. und 600. Tag kein einziges Tier starb. Dies ergibt bei einer Summation der Absterberaten bis 100%, gegen die Latenzzeit bis zum Todeszeitpunkt aufgetragen, einen terrassenartigen Kurvenverlauf, wobei die Knickpunkte am 480. und 760. Tag liegen. Wodurch die erhöhten Absterberaten zu bestimmten Zeitpunkten hervorgerufen wurden, geht aus den Absterberaten nicht hervor. Eine Pneumonie - Epidemie unter den Versuchstieren kann als Ursache ausgeschlossen werden, da die Tiere zeitlich gestaffelt in den Versuch aufgenommen wurden.

#### b) 30 Tage DÄNA - Fütterung

Die 30 Tage lang mit DÄNA gefütterten Tiere lebten nach Hepatektomie noch durchschnittlich 446 Tage, wobei die größte Häufung

der Absterbeziffern zwischen dem 500. und 550. Tag zu finden war. Rabes und Zettler (1974) fanden dagegen für die gleiche Fütterungsdauer ohne Hepatektomie eine mittlere Überlebenszeit von 485 Tagen; demnach würde die Hepatektomie eine Verkürzung der Lebenszeit von etwa 40 Tagen bedeuten. Neben den auch durch 15-tägige DÄNA - Fütterung hervorgerufenen Veränderungen fanden sich hier bei einer Anzahl von Tieren auch eindeutige maligne Tumoren der Leber, teilweise mit Metastasierung. Hier dürfte die Hepatektomie eine deutliche Wirkung auf die Tumorentstehung ausüben, da nach solch kurzer DÄNA - Gabe allein niemals eine Tumorausbeute von 50% beschrieben wurde. Ergebnisse von Scholze (1972) und Hoffmann (1970) sprechen ebenfalls dafür, daß eine größere Resektion während des toxischen Initialstadiums, nicht aber in späteren Stadien, die Überlebenszeit verkürzt. Allerdings scheint die Überlebenszeit nur ein sehr grober Parameter für den Ausbildungsgrad eines Tumors zu sein. Die Todesursache ist für die meisten Tiere eine offene abdominelle Hämorrhagie aus arrodiierten Gefäßen des Lebertumors.

### 3.2.2. Zur histologischen Auswertung der Präparate

Wie aus den übereinstimmenden Versuchsergebnissen mehrerer Autoren zu entnehmen ist (Friedrich - Freksa et al. 1969, Thomas 1961, Grundmann und Sieburg 1962), werden durch kontinuierliche oder diskontinuierliche DÄNA - Fütterung fast ausschließlich hepatozelluläre Karzinome hervorgerufen, die entweder trabekulär oder papillär wachsen, und gelegentlich in ein entdifferenziertes Karzinom übergehen. Im vorliegenden Versuch, vor allem nach

15 Tagen DÄNA, konnten jedoch auch ebensoviele cholangioläre Karzinome beobachtet werden; dazu noch in Form der kleinen cholangiomartigen Zellgruppen potentielle Vorläufer für weitere Cholangiokarzinome. Leider konnten bei den 30 Tage mit DÄNA gefütterten Tieren wegen Einblutung oder Autolyse keine weiteren Karzinome zum Zwecke einer quantitativen Gegenüberstellung bei der Tumorarten untersucht werden. Auf jeden Fall scheint durch die Hepatektomie das Verhältnis weit zugunsten der cholangiolären Tumoren verschoben zu werden. Der Grund dafür ist möglicherweise eine durch die Resektion angeregte Proliferation der kleinen Gallengänge, die bei Anwendung anderer Kanzerogene (Price et al. 1952, Farber 1956) auch ohne Hepatektomie auftritt.

Im Zusammenhang damit fordern Sneider und Potter (1969) die Existenz eines oder mehrerer Typen primitiver protohepatocytärer Stammzellen, die als Vorläufer sowohl für Gallengangs- als auch Parenchymzellen dienen. Eine Bestätigung für diese Hypothese steht indessen noch aus.

### 3.3. SCHLUSSBEMERKUNG

In den vorliegenden Versuchen sollten die Auswirkungen eines Proliferationsreizes auf den Ablauf der Kanzerogenese untersucht werden. Als Initiierung diente eine niedrige Kanzerogendosis, die über einen kurzen Zeitraum appliziert wurde; der Proliferationsreiz wurde durch eine standardisierte Teilhepatektomie gesetzt.

Bei 15-tägiger Fütterung von 5mg DÄNA/kg/Tag ist die Kanzerogengesamtmenge zu gering: der Proliferationsreiz führt nicht zu einer Umwandlung potentiell präneoplastischer Zellbezirke in autonom proliferierende neoplastische Clone. Dies zeigt sich einerseits im Wachstumsverhalten der untersuchten Enzymdefektbezirke, andererseits in einem nur sehr sporadischen Auftreten von malignen Tumoren.

Die hepatotrope Wirkung des DÄNA tritt bei dieser niedrigen Dosis in Kombination mit Hepatektomie hinter der Entwicklung von cholangiolärer Proliferation, Nierentubulusadenomen und einer leukämoiden Reaktion zurück. Die unspezifisch - toxische Wirkung, möglicherweise am Immunsystem oder am Knochenmark, könnte für eine Resistenzschwächung gegen interkurrente Infekte verantwortlich sein.

Eine Kanzerogengabe von 30 Tagen reicht aus, um die Hepatozyten soweit zu verändern, daß eine darauf folgende Hepatektomie bei der Hälfte der Versuchstiere zu malignen Tumoren führt. Dabei ist die durchschnittliche Überlebenszeit der Versuchstiere gegenüber nicht hepatektomierten Tieren um 40 Tage verkürzt, was eine Verringerung der Latenzzeit von fast 10% bedeutet.

Die interkurrenten Infekte verlieren hier gegenüber dem Auftreten von Karzinomen an Bedeutung.

Über die Initiation der Zelltransformation mit chemischen Kanzerogenen sind in letzter Zeit große Fortschritte gemacht worden (z.B. Loveless, Craddock, Goth und Rajewsky, Magee).

Eine quantitative Analyse der Vorgänge während der präneoplastischen Latenzperiode, die Frage der biologischen Realisation eines Tumors aus initiierten Zellen sind noch schwieriger zu lösen wegen der Wechselbeziehungen zwischen präneoplastischen Zellen und Wirt. Die Anregung der Proliferation ist dabei sicherlich ein wesentlicher Faktor, und weitere Untersuchungen mit dem Modell der regenerierenden Leber würden gute Voraussetzungen bieten, bessere Einblicke in diese Zusammenhänge zu gewinnen.

#### 4. ZUSAMMENFASSUNG

Diäthylnitrosamin erzeugt bei einer Dosierung von 5mg/kg/Tag in der Rattenleber nach einer Latenzzeit von 130 - 150 Tagen Hepatome und hepatozelluläre Karzinome. Während dieser Latenzperiode vor der Manifestation der Karzinome vollziehen sich Veränderungen sowohl im Proliferationsverhalten als auch im Funktionsstoffwechsel einzelner Zellgruppen. Diese können mit autoradiographischen und enzymhistochemischen Methoden nachgewiesen werden.

Eine standardisierte Teilhepatektomie erzeugt in den Hepatozyten eine Welle von Mitosen und regt das Organ solange zur Proliferation an, bis das ursprüngliche Gewicht wieder erreicht ist. Im vorliegenden Versuch sollten die Auswirkungen eines solchen Wachstumsreizes auf die erwähnten präneoplastischen Veränderungen in Bezug auf Proliferationsverhalten und Größenentwicklung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hepatektomie untersucht werden. Darüber hinaus wurde eine Gesetzmäßigkeit gesucht, nach der die enzymdefizienten Zellinseln im Leberparenchym entstehen.

Eine weitere Frage war, ob eine Teilhepatektomie die DÄNA-Kanzerogenese bei sonst nicht krebserzeugenden, niedrigen Dosen im Sinne eines Promotionsfaktors beschleunigt. Eine Beeinflussung der Kanzerogenese sollte nach der Überlebenszeit der Tiere und der Häufigkeit der Tumoren zum Zeitpunkt ihres Todes beurteilt werden.

Adulte, männliche Ratten (Wistar AF/Han) erhielten 5mg DÄNA/kg/Tag im Trinkwasser für 15 bzw. 30 Tage. Am Ende der Kanzerogengabe wurden die Tiere 2/3-hepatektomiert.

Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität zu verschiedenen Zeitpunkten nach Hepatektomie wurden die DNS - synthetisierenden Zellen (S - Phasen - Zellen) mit  $^3\text{H}$ -Thymidin markiert. Dabei wurden 6  $^3\text{H}$ -TdR - Markierungen mit 6-stündigen Intervallen zwischen den einzelnen Injektionen durchgeführt, um die gesamte Wachstumsfraktion zu erfassen; eine Stunde nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet. Die aus den Lebern gewonnenen Kryostatserienschnitte wurden alternierend zur Herstellung von Autoradiographien und zur histochemischen Darstellung der ATPase und G-6-Pase verwendet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Maskenvergleichsmikroskops, bei dem Autoradiographie und Enzympräparat parallel betrachtet werden konnten. Die Wachstumskinetik der enzymdefizienten Parenchyminseln wurde durch Bestimmung ihrer Anzahl pro  $\text{cm}^2$  Leberschnittfläche untersucht; die Proliferationskinetik der EDB ergab sich aus ihrem Flächenwachstum und aus der Entwicklung der Zellzahlen. Mit Hilfe der Autoradiographien, die mit den Enzympräparaten optisch zur Deckung gebracht wurden, konnte die Proliferationsaktivität der Zellen in den Enzymdefektbezirken und im normalen Parenchym zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten beurteilt werden.

Bei der statistischen Auswertung wurden der Mittelwert sowie der mittlere Fehler des Mittelwerts und die Standardabweichung berechnet.

Eine Kontrollgruppe wurde nach 15- bzw. 30-tägiger DÄNA - Fütte-

rung mit anschließender Hepatektomie ohne weitere Behandlung beobachtet. Der Todeszeitpunkt der Versuchstiere wurde registriert, aus ihren Organen wurden Paraffinschnitte zur histologischen Begutachtung hergestellt.

Die Untersuchungen brachten folgende Ergebnisse:

1. a) Nach 15-tägiger DÄNA - Fütterung nahm die durchschnittliche Anzahl der Enzymdefektbezirke pro  $\text{cm}^2$  Leberschnittfläche vom 40. bis 360. Tag nach Hepatektomie etwa um den Faktor 4 zu. Dabei war zuerst ein geringer Abfall mit anschließendem linearen Anstieg zu verzeichnen.

b) Nach 30-tägiger Behandlung nahm die mittlere Anzahl der EDB pro  $\text{cm}^2$  zwischen dem 10. und 280. Versuchstag vom nahezu gleichen Ausgangswert ebenfalls um den Faktor 4 zu. Hier war der Anstieg zuerst steiler und flachte sich gegen Versuchsende hin ab.

2. a) Die Größe der EDB nahm bei 15-tägiger Kanzerogenfütterung zwischen dem 40. und 160. Tag nach Hepatektomie zu, zeigte bis zum 280. Tag einen leichten Abfall und zwischen dem 280. und 360. Tag einen steilen Anstieg.

Die Entwicklung der Zellzahl in den EDB lief zu allen Versuchszeitpunkten mit der Größenentwicklung annähernd parallel.

b) Bei 30-tägiger Behandlung zeigte die Größe der EDB vom 10. bis zum 70. Versuchstag einen Anstieg, zum 100. Tag hin eine Abnahme und am 160. und 280. Tag eine weitere sehr starke Zunahme. Die Anzahl der in den EDB enthaltenen Zellen zeigte bis zum 160. Versuchstag eine etwa parallele Entwicklung mit der Größe; dem starken Größenzuwachs zwischen dem 160. und 280. Tag stand hier

jedoch nur eine geringe Zunahme der Zellzahl gegenüber. Dies läßt sich mit einer zu diesem Zeitpunkt eintretenden starken Vergrößerung der Einzelzellen erklären.

3. a) Die Markierungsindices in den Enzymdefektbezirken fielen bei den 15 Tage mit DÄNA gefütterten Tieren vom 40. bis 160. Versuchstag ab und lagen am 280. und 360. Tag wieder gering über dem Ausgangswert.

Zu allen Zeitpunkten war die Markierung im normalen, nicht enzymdefizienten Parenchym geringer als in den Defektbezirken, verlief jedoch annähernd parallel zu den EDB - Markierungen.

b) Nach 30-tägiger Kanzerogengabe war der Markierungsindex der EDB und des Normalparenchyms durch die auslaufende DNS - Synthesewelle noch stärker erhöht. Einem Abfall am 40. und 70. Versuchstag folgte am 100. Tag ein Maximum und am 160. und 280. Tag ein erneuter Rückgang.

Auch hier zeigten EDB - und Parenchymmarkierungen einen annähernd parallelen Kurvenverlauf.

Weder nach 15- noch nach 30-tägiger DÄNA - Behandlung zeigten die Enzymdefektbezirke also eine Tendenz zu autonomem, malignem Wachstum. Die basale Proliferationsaktivität war lediglich um ein mehrfaches gegenüber dem normalen Parenchym erhöht.

4. a) Die 15 Tage mit DÄNA gefütterten und anschließend hepatektomierten Kontrolltiere hatten eine mittlere Überlebensdauer von 592 Tagen. Obwohl keine Vergleichswerte für nicht hepatektomierte Tiere vorliegen, wird vermutet, daß eine Hepatektomie zu diesem frühen Stadium der Kanzerogenese die Überlebenszeit verkürzt.

Histologisch wurden zwei cholangioläre und ein hepatozelluläres Karzinom gefunden. Außerdem zeigten sich bei mehreren Tieren Bezirke mit fokaler cholangiolärer Proliferation; ein Tier zeigte ein metastasierendes Plattenepithelkarzinom der Nasenschleimhaut, ein weiteres eine leukämoide Reaktion. In einem Fall fanden sich Tubulusadenome der Niere. Die Hälfte der Tiere starb an interkurrenten Infekten der Lunge.

b) Bei den 30 Tage lang mit DÄNA behandelten Kontrolltieren betrug die durchschnittliche Überlebenszeit 446 Tage nach Hepatektomie, was eine Verkürzung gegenüber nicht hepatektomierten Tieren um 40 Tage bedeutet.

Die Hälfte der untersuchten Tiere wiesen zum Zeitpunkt ihres Todes Tumoren, teilweise mit Metastasierung, auf. Dabei überwog die Anzahl der hepatozellulären Karzinome diejenige der cholangiolären Karzinome. Ein Teil der Tiere zeigte fokale cholangioläre Proliferation. In mehreren Fällen war eine gemischttröpfige Leberzellverfettung mit periportal Fibrose zu beobachten.

Nach diesen Ergebnissen kann angenommen werden, daß ein Proliferationsreiz das Wachstumsverhalten präneoplastischer Bezirke in der Leber und die Tumorentstehung modifiziert.

LITERATURVERZEICHNIS

- ABELEV, G.I., S.D. PEROVA, N.I. KHRAMKOVA, Z.A. POSTNIKOVA,  
and I.S. JRLINE: Production of Embryonal Alpha-Globulin by  
Transplantable Mouse Hepatoma. Transplantation 1: 174 (1963)
- ABELL, C.W., and C. HEIDELBERGER: Interaction of Carcinogenic  
Hydrocarbons with Tissues. VIII: Binding of Tritium-labeled  
Hydrocarbons to the Soluble Proteins of Mouse Skin. Cancer  
Res. 22: 931 (1962)
- ALLISON, A.C., and L. MALLUCCI: Uptake of Hydrocarbon Carcino-  
gens by Lysosomes. Nature 203: 1024 (1964)
- AMANO, H., and R. DAOUST: The Distribution of Ribonuclease Ac-  
tivity in Rat Liver during Azo-Dye Carcinogenesis. J. Histo-  
chem. Cytochem. 9: 161 (1961)
- AMBELLAN, E., and V.P. HOLLANDER: The Role of Ribonuclease in  
Regression of Lymphosarcoma P1798. Cancer Res. 26: 903 (1966)
- BANNASCH, P.: Nitrosamin-induzierte Glykogenose und Geschwulst-  
bildung in der Rattenleber. Verh. Dtsch. Ges. Path. 51: 343  
(1967)
- BANNASCH, P.: The Cytoplasm of Hepatocytes During Carcinogene-  
sis. Springer, New York (1968)
- BECKER, F.F., and K.M. KLEIN: The Effect of L-Asparaginase on  
Mitotic Activity during N-2-Fluorenylacetamide Hepatocarci-  
nogenesis: Subpopulations of Nodular Cells. Cancer Res 31:  
169 (1971)
- BERENBLUM, I.: Some Recent Advances in Skin Carcinogenesis.  
Ann. R. Coll. Surg. Engl. 21: 339 (1957)

- BERTRAM, J.S., and C. HEIDELBERGER: Cell Cycle Dependency of Oncogenic Transformation Induced by N-methyl-N-nitrosoguanidine in Culture. *Cancer Res.* 34: 526 (1974)
- BÖRNER, P., und W. GÖSSNER: Enzymhistochemische Untersuchungen der Adenosin-Triphosphatase, der alkalischen und sauren Phosphatase sowie der Succinodehydrogenase im Leberparenchym der Ratte während der Einwirkung des Kanzerogens Diäthyl-nitrosamin. *Zschr. Naturforsch.* 23b: 1085 (1968)
- BOREK, E.: The Methylation of Transfer RNA: Mechanism and Function. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28: 139 (1963).
- BRIERE, N., and R. DAOUST: Histochemical Studies on Rat Liver Proteins during 4-Dimethylaminoazobenzene Carcinogenesis. *Cancer Res.* 30: 1370 (1970)
- BROUWERS, J.A.J., and P. EMMELOT: Microsomal N-Demethylase and the Effect of the Hepatic Carcinogen Dimethylnitrosamine on Amino Acid Incorporation into the Proteins of Rat Livers and Hepatomas. *Exper. Cell. Res.* 19: 467 (1960)
- BUCHER, N.L.R.: Regeneration of Mammalian Liver. *Int. Rev. Cytol.* 15: 245 (1963)
- BUCHER, N.L.R., and M.N. SWAFFIELD: The Rate of Incorporation of Labelled Thymidine into the Deoxyribonucleic Acid of Regenerating Rat Liver in Relation to the Amount of Liver Excised. *Cancer Res.* 24: 1611 (1964)
- BÜCHNER, F.: Die experimentelle Kanzerisierung der Parenchymzelle in der Synopsis klassischer und moderner morphologischer Methoden. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 45: 37 (1961)
- BURSTEIN, N.A., and A.C. ALLISON: Effect of Antilymphocytic Serum on the Appearance of Reticular Neoplasms in SJL/J Mice. *Nature* 225: 1139 (1970)
- CHERNOZEMSKI, I.N., and G.P. WARWICK: Liver Regeneration and Induction of Hepatomas in B6AF<sub>1</sub> Mice By Urethane. *Cancer Res.* 30: 2685 (1970a)

- CÔTÉ, J.W., W. OEHLERT und F. BÜCHNER: Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese während der experimentellen Kanzerisierung durch Diäthylnitrosamin. Beitr. Path. Anat. 127: 450 (1962)
- CRADDOCK, V.M.: Stability of Desoxyribonucleic Acid Methylated in Intact Animal by Administration of Dimethylnitrosamine. Biochem. J. 111: 497 (1969)
- CRADDOCK, V.M.: Liver Carcinogenesis Induced in Rats by Single Administration of Dimethylnitrosamine after Partial Hepatectomy. J.Nat. Cancer Inst. 47: 889 (1971)
- CRADDOCK, V.M.: The Pattern of Methylated Purines Formed in the DNA of Intact and Regenerating Liver of Rats Treated with the Carcinogen Dimethylnitrosamine. Biochim. Biophys. Acta 312: 202 (1973)
- CRADDOCK, V.M.: Induction of Liver Tumors in Rats by a Single Treatment with Nitroso Compounds given after Partial Hepatectomy. Nature 245: 386 (1973a)
- CRADDOCK, V.M.: Effect of a Single Treatment with the Alkylating Carcinogens Dimethylnitrosamine, Diethylnitrosamine and Methyl Methansulfonate on Liver Regenerating after Partial Hepatectomy. I. Test for Induction of Liver Carcinomas. II. Alkylation of DNA and Inhibition of DNA Replikation. Chem.-Biol. Interactions 10: 313, 323 (1975)
- CRADDOCK, V.M. and J.V. FREI: Induction of Liver Cell Adenomata in the Rat by a Single Treatment with N-Methyl-N-Nitrosourea Given at Various Times after Partial Hepatectomy. Brit. J. Cancer 30: 503 (1974)
- CRADDOCK, V.M. and P.N. MAGEE: Reaction of the Carcinogen Dimethylnitrosamine with Nucleic Acids in vivo. Biochem. J. 89: 32 (1963)
- CRADDOCK, V.M., and P.N. Magee: Methylation of Liver DNA in the Intact Animal by the Carcinogen Dimethylnitrosamine during Carcinogenesis. Biochim. Biophys. Acta 95: 677 (1965)

- CRAIDOCK, V.M. and P.N. MAGEE: Analysis of Bases of Rat Liver Nucleic Acids after Administration of the Carcinogen Dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* 100: 724 (1966)
- DAOUST, R.: Cellular Populations and Nucleic Acid Metabolism in Rat Liver Parenchyma during Azo Dye Carcinogenesis. *Can. Cancer Conf.* 5: 225 (1963)
- DAOUST, R. and H. AMANO: Ribonuclease and Desoxyribonuclease Activities in Experimental and Human Tumors by the Histochemical Substrate Film Method. *Cancer Res.* 23: 131 (1963)
- DRUCKREY, H.: Quantitative Aspects in Chemical Carcinogenesis. UICC Monograph series, Vol.7 Berlin, Heidelberg, New York; Springer Verlag (1967)
- DRUCKREY, H., S. IVANKOVIC, and R. PREUSSMANN: Selective Induction of Malignant Tumors in Brain and Spinal Cord of Rats with Nitrosomethylurea. *Zschr. Krebsforsch.* 66: 389 (1965)
- DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC und D. SCHMÄHL: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitrosoverbindungen an BD-Ratten. *Zschr. Krebsforsch.* 69: 103 (1967)
- DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, D. SCHMÄHL, und M. Miller: Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen. *Naturwissenschaften* 48: 134 (1961)
- DRUCKREY, H., und D. SCHMÄHL: Quantitative Analyse der experimentellen Krebserzeugung. *Naturwissenschaften* 49: 218 (1962)
- EDER, M., O. BUTENANDT, und R. JOSTEN: Morphologische, histochemische und autoradiographische Untersuchungen zur akuten und chronischen Thioacetamidvergiftung. *Z. Path.* 74: 599 (1965)
- EMMELOT, P., and E.L. BENEDETTI: Changes in the Fine Structure of Rat Liver Cells Brought about by Dimethylnitrosamine. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7: 393 (1960)
- DEN ENGELSE, E. and P. EMMELOT: Effects of Feeding the Carcinogen Dimethylnitrosamine on its Metabolism and Methylation of DNA in the Mouse. *Chem.-Biol. Interactions* 4: 321 (1971)

- EPSTEIN, S.M., N. ITO, L. MERKOW, and E. FARBER: Cellular Analysis of Liver Carcinogenesis of Large Hyperplastic Nodules in the Liver with 2-Fluorenylacetylamine or Ethionine and some Aspects of their Morphology and Glycogen Metabolism. *Cancer Res.* 27: 1702 (1967)
- EPSTEIN, S.M. J. McNARY, B. BARTUS, and E. FARBER: Chemical Carcinogenesis persistence of Bound Forms of 2-Fluorenylacetylamine. *Science* 162: 907 (1968)
- FABRIKANT, J.I.: The Kinetics of Cellular Proliferation in Regenerating Liver. *J. Cell Biol.* 36: 551 (1968)
- FARBER, E.: Similarities in the Sequence of Early Histological Changes Induced in the Liver of the Rat by Ethionine, 2-Acetylaminofluorene and 3'-Methyl-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 16: 142 (1956)
- FARBER, E.: Hyperplastic Liver Nodules. *Methods in Cancer Research.* ed. H. Busch, Vol. VII. Academic Press New York and London (1973)
- FARBER, E., J. McNAMONY, B. FRAZEN, F. MARROQUIN, G.A. STEWART, and P.N. MAGEE: Interaction between Ethionine and Rat Liver Ribonucleic Acid and Protein. *Cancer Res.* 27: 1761 (1967)
- FAUSTO, N., and J.L. VAN LANCKER: Molecular mechanisms of Liver Regeneration. IV. Thymidylate Kinase and DNA Polymerase Activities in Normal and Regenerating Liver. *J. Biol. Chem.* 240: 1247 (1965)
- FIALA, S., and A.E. FIALA: On the Correlation between Metabolic and Structural Changes during Carcinogenesis in Rat Liver. *Brit. J. Cancer* 13: 136 (1959a)
- FIALA, S., and A.E. FIALA: Intracellular Localisation of Carcinogen and its Relationship to the Mechanism of Carcinogenesis in Rat Liver. *Brit. J. Cancer* 13: 236 (1959b)
- FISCHER, A.: Dynamics in the Circulation of the Liver. Edited by Ch. Rouiller: Morphology, Biochemistry, Physiology; Vol. I: 329 Academic Press New York and London (1963)

- FREI, J.V., and A.C. RITCHIE: Diurnal Variations in the Susceptibility of Mouse Epidermis to Carcinogen and its Relationship to DNA-Synthesis. J. Natn. Cancer Inst. 32: 1213 (1964)
- FRIEDRICH-FREKSA, H.: Kurzmitteilungen in: Max-Planck Gesellschaft 1968-1969 12: 659 (1970)
- FRIEDRICH-FREKSA, H., W. GÖSSNER, und P. BÖRNER: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 72:226 (1969)
- FRIEDRICH-FREKSA, H., and M. HOFFMANN: Immunological Defence against Preneoplastic Stages of Diethylnitrosamine-induced Carcinomas in Rat Liver. Nature 223: 1162 (1969)
- FRIEDRICH-FREKSA, H., G. PAPADOPULU, und W. GÖSSNER: Histochemische Untersuchungen in der Rattenleber nach zeitlich begrenzter Verabfolgung von Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 72: 240 (1969)
- GERCHMANN, L.L., and D.B. LUDLUM: Properties of  $O^6$ -Methylguanine in Templates for RNA Polymerase. Biochim. Biophys. Acta 308: 310 (1973)
- GODWIN, E.L.R., K.R. REES, and J.S. VARCOE: Nuclear RNA Synthesis in Rat Liver during Early Stages of Chemical Carcinogenesis. Brit. J. Cancer 21: 166 (1967)
- GÖSSNER, W., und H. FRIEDRICH-FREKSA: Histochemische Untersuchungen der Kanzerogenese in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine. Zschr. Naturforsch. 19b: 862 (1964)
- GOTH, R., and M.F. RAJEWSKY: Ethylation of Nucleic Acids by Ethylnitrosourea- $1-^{14}C$  in the Fetal and Adult Rat. Cancer Res. 32: 1501 (1972)
- GRISHAM, J.W.: Inhibitory Effect of Tritiated Thymidine on Regeneration of the Liver in the Young Rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105: 555 (1960)

- GRISHAM, J.W.: A Morphologic Study of Deoxyribonucleic Acid Synthesis and Cell Proliferation in Regenerating Rat Liver; Autoradiography with Thymidine- $H^3$ . Cancer Res. 22: 842 (1962)
- GRISHAM, J.W.: Cellular Proliferation in the Liver. Ed. by R.J.M. Fry, M.L. Griem and W.H. Kirsten: Normal and Malignant Cell Growth. Springer Verlag New York p.28 (1969)
- GRUNDMANN, E., und H. SIEBURG: Die Histogenese und Cytogenese des Leberkarzinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild. Beitr. Pathol. Anat. 126: 57 (1962)
- HARKNESS, R.D.: Regeneration of the Liver. Brit. Med. Bull. 13: 87 (1957)
- HEATH, D.F.: The Decomposition and Toxicity of Dialkylnitrosamines in Rats. Biochem. J. 85: 72 (1962)
- HEMPEL, K., K.I. LENNARTZ, und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchungen zum Eiweiß-Stoffwechsel im Kern und Cytoplasma der normalen und durch Buttergelb kanzerisierten Leberzelle. Beitr. Path. Anat. 126: 381 (1962)
- HENNINGS, H., D. MICHAEL, and E. PATTERSON: Enhancement of Skin Tumorigenesis by a Single Application of Croton Oil before or soon after Initiation by Urethan. Cancer Res. 33: 3130 (1973)
- HIGGINS, G.M., and R.M. ANDERSON: Experimental Pathology of the Liver. I. Restoration of the Liver of the White Rat Following Partial Surgical Removal. Arch. Path. 12: 186 (1931)
- HOBRIK, H.P. und E. GRUNDMANN: Quantitative Veränderungen der DNS und der RNS in der Rattenleberzelle während der Carcinogenese durch Diäthylnitrosamin. Beitr. Path. Anat. 127:25 (1962)
- HOFFMANN, M.: Critical Time Dependence of Effect of Liver Regeneration on Carcinogenesis in Rat Liver. Zschr. Naturforsch. 25b: 434 (1970)

- HUTTERER, F., F.M. KLION, A. WEINGRAF, F. SCHAFFNER, and H. POPPER: Hepatocellular Adaption and Injury. Structural and Biochemical Changes Following Dieldrin and Methyl But-ter Yellow. Lab. Invest. 20: 455 (1969)
- KITIGAWA, T. Responsiveness of Hyperplastic Lesions and Hepato-mas to Partial Hepatectomy. Gann 62: 217 (1971)
- KITIGAWA, T., and H.C. PITOT: The Regulation of Serine Dehydro-genase and Glucose-6-Phosphatase in Rat Liver during Diethyl-nitrosamine and N-2-Fluorenylacetamide Feeding: A Histoche-mical Study. Cancer Res. 35: 1075 (1975)
- KNECHT, M.: Untersuchungen über eine mikrosomale N-Demethylase in verschiedenen Organen der Ratte in vitro. Zschr. Natur-forsch. 21b: 799 (1966)
- KRÖGER, H., und H. KESSEL: Enzyminduktion und Nukleinsäurestoff-wechsel unter dem Einfluß organspezifischer Nitrosamine. Zschr. Naturforsch. 23b: 1240 (1968)
- LAW, L.W.: Effects of Antilymphocyte Serum on the Induction of Neoplasms of Lymphoreticular Tissues. Fedn. Proc. 29: 171 (1970)
- LAWLEY, P.D., and P. Brookes: Acidic dissociation of 7:9-Dial-kylguanines and its possible Relation to Mutagenic Properties of Alkylating Agents. Nature 192: 1081 (1961)
- LAWLEY, P.D., P. BROOKES, P.N. MAGEE, V.M. CRADDOCK, and P.F. SWANN: Methylated Bases in Liver Nucleic Acids from Rats Treated with Dimethylnitrosamine. Biochem. Biophys. Acta 157: 646 (1968)
- LAWLEY, P.D., and S. SHAH: Methylation of DNA by  $^3\text{H}$ - $^{14}\text{C}$ -methyl-labelled N-Methyl-N-Nitrosourea: Evidence for the Transfer of the intact Methyl Group. Chem.-Biol. Interactions 7:115 (1973)
- LAWLEY, P.D., and C.J. THATCHER: Methylation of Deoxyribonucle-ic Acid in Cultured Mammalian Cells by N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine: The Influence of Cellular Thiol Concentra-tion on the extent of Methylation and the 6-Oxygen-Atom of

- Guanine as a Site of Methylation. *Biochem. J.* 116: 693 (1970)
- LAWS, J.O.: Tissue Regeneration and Tumour Development. *Brit. J. Cancer* 13: 669 (1959)
- LEAVER, D.D., P.F. SWANN, and P.N. MAGEE: Induction of Tumours in the Rat by a Single Dose of N-Nitrosomethylurea. *Brit. J. Cancer* 23: 177 (1969)
- LIJINSKY, W., H.GARCIA, L. KEEFER, J. LOO, and A.E. ROSS: Carcinogenesis and Alkylation of Rat Liver Nucleic Acids by Nitrosomethylurea and Nitrosoethylurea Administered by Intraportal Injection. *Cancer Res.* 32: 893 (1972)
- LINKE, A.: Enzyminduktion im Hungerzustand. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 68:273 (1962)
- LOEB, L.A., C.F. SPRINGGATE, and N. BATTULA: Errors in DNA Replication as a Basis of Malignant Changes. *Cancer Res.* 34: 2311 (1974)
- LOVELESS, A.: Possible Relevance of O<sup>6</sup>-Alkylation of Deoxyguanosine to the Mutagenicity of Nitrosamines and Nitrosamides. *Nature* 223: 206 (1969)
- LYNCH, W.E., and J. LIEBERMANN: A DNA Polymerase in Liver Nuclei whose Activities Rise with DNA-Synthesis after Partial Hepatectomy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52: 843 (1973)
- MAGEE, P.N.: Toxic Liver Injury. The Metabolism of Dimethylnitrosamine. *Biochem. J.* 64: 676 (1956)
- MAGEE, P.N.: Toxic Liver Injury. Inhibition of Protein Synthesis in Rat Liver by Dimethylnitrosamine in Vivo. *Biochem. J.* 70: 606 (1958)
- MAGEE, P.N., and J.M. BARNES: The Production of Malignant Primary Hepatic Tumors in the Rat by Feeding Dimethylnitrosamine. *Brit. J. Cancer* 10: 114 (1956)
- MAGEE, P.N., and J.M. BARNES: Carcinogenic Nitroso Compounds. *Advan. Cancer Res.* 10: 163 (1967)

- MAGEE, P.N. and K.Y. LEE: Cellular Injury and Carcinogenesis. Biochem. J. 91: 35 (1964)
- MAINI, M.M., and H.F. STICH: Chromosomes of Tumor Cells. III. Unresponsiveness of Precancerous Hepatic Tissues and Hepatomas to a Mitotic Stimulus. J. Nat. Cancer Inst. 28: 753 (1962)
- MARQUARDT, H., S. STERNBERG, and F.S. PHILIPS: 7.12-Dimethylbenz(a)anthracene and Hepatic Neoplasia in Regenerating Rat Liver. Chem. Biol. Interactions 2: 401 (1970)
- MASON, H.S., J.C. NORTH, and M. VANNESTE: Microsomal Mixed Function Oxidations: the Metabolism of Xenobiotics. Fed. Proc. 24: 1172 (1965)
- MEISTER, P., und H.M. RABES: Nierentumoren durch Diäthylnitrosamin nach partieller Leberresektion: Morphologie und Wachstumsverhalten. Zschr. Krebsforsch. 80: 169 (1973)
- MENDELSON, M.L.: Autoradiographic Analysis of Cell Proliferation of Spontaneous Breast Cancer of C3H-Mouse. III. The Growth Fraction. J. Nat. Cancer Inst. 28: 1015 (1962a)
- MENDELSON, M.L.: Chronic Infusion of Tritiated Thymidine into Mice with Tumors. Science 135: 213 (1962b)
- MILLER, J.A., and E.C. MILLER: The Carcinogenic Aminoazo Dyes. Advan. Cancer Res. 1: 339 (1953)
- MOHR, U., R. SPEETZEN, und M. KNECHT: Die Regeneration der chromin durch Diäthylnitrosamin geschädigten Leber nach Teilhepatektomie. Zschr. Naturforsch. 23: 528 (1968)
- MOHR, U., R. SPEETZEN, und H. WRBA: Zur Proliferationsaktivität der durch Diäthylnitrosamin geschädigten Leber nach Teilhepatektomie. Naturwissensch. 54: 566 (1967)
- NOLTE, J. and D. PETTE: Microphotometric Determination of Enzyme Activity in Single Cells in Cryostate Sections. I. Application of the Gel Film Technique to Microphotometry and Studies on the Intralobular Distribution of Succinate Dehydrogenase and Lactate Dehydrogenase Activities in Rat Liver. J. Histochem. Cytochem. 20: 567 (1972)

- OEHLERT, W., and J. CÔTÉ: Developmental Stages of Mouse Squamous Cell Carcinoma: Autoradiographic Investigations Using  $H^3$ -Thymidine,  $H^3$ -Cytidine, and  $H^3$ -Leucin. In: Proceedings on an International Conference on the Morphological Precursors of Cancer. Ed. by Severi, L., p 541 (1962)
- OEHLERT, W., J. CÔTÉ und F. BÜCHNER: Autoradiographische Untersuchungen zur Cancerisierung der Epidermiszelle der Mäusehaut nach Methylcholanthrenpinselung. Beitr. Path. Anat. 125: 280 (1961)
- OEHLERT, W., W. HÄMMERLING, und F. BÜCHNER: Der zeitliche Ablauf der Desoxyribonukleinsäuresynthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie. Beitr. Path. Anat. 126: 91 (1962)
- OEHLERT, W., und J. HARTJE: Die Veränderungen des Eiweiß- und Ribonukleinsäurestoffwechsels der Leberepithelzelle während der experimentellen Cancerisierung durch Diäthylnitrosamin. Beitr. Path. Anat. 128: 376 (1963)
- OKITA, K., M. GRUENSTEIN, M. KLAIBER, and E. FARBER: Localisation of alpha-Fetoprotein by Immunofluorescence in Hyperplastic Nodules during Hepatocarcinogenesis Induced by 2-Acetylaminofluorene. Cancer Res. 34: 2758 (1974)
- OFIE, E.L.: The Pathogenesis of Tumors of the Liver Produced by Butter Yellow. J. Exp. Med. 80: 231 (1944)
- PACK, G.T., A.H. ISLAMI, J.C. HUBBARD, and R.D. BRASFIELD: Regeneration of Human Liver after Major Hepatectomy. Surgery 52: 617 (1962)
- PAPADOPULU, G.: Histochemische Untersuchungen an der Rattenleber nach Verabfolgung von Nitrosaminen. Diss. Tübingen (1967)
- PASCHKIS, K.E., J. GODDARD, A. CANTAROW, and S. ADIBI: Stimulation of Growth by Partial Hepatectomy. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101: 184 (1959)
- PETTE, D., und H. BRANDAU: Enzym-Histogramme und Enzymaktivitätsmuster der Rattenleber. Enzymol. Biol. Clin. 6: 79 (1966)

- PITOT, H.C.: Some Biochemical Aspects of Malignancy. *Ann Rev. Biol.* 35: 335 (1966)
- PORTER, K.R. and C. BRUNI: An Electron Microscopic Study on the Early Effects of 3'-Me-DAB on Rat Liver Cells. *Cancer Res.* 19: 997 (1959)
- PRICE, J.M., J.W. HARMAN, E. MILLER, and J.A. MILLER: Progressive Microscopic Alterations in the Livers of Rats Fed the Hepatic Carcinogens 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene and 4'-Fluoro-4-Dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 12: 192 (1952)
- QUASTLER, H., and F.G. SHERMAN: Cell Population Kinetics in the Intestinal Epithelium of the Mouse. *Exp. Cell. Res.* 17: 420 (1959)
- RABES, H.M.: Bestimmung der Zellzyklusphasen in heterogenen Tumorzellpopulationen in vivo. *Zschr. Naturforsch.* 24b: 468 (1969)
- RABES, H.M.: Kinetics of Hepatocellular Proliferation after Partial Resection of the Liver. *Progr. in Liver Diseases Vol. V: 83*, eds. H. Popper and F.S. Schaffner, Grune and Stratton, New York (1976)
- RABES, H.M., and H. BRÄNDLE: Synthesis of RNA, Protein, and DNA in the Liver of Normal and Hypophysectomized Rats after Partial Hepatectomy. *Cancer Res.* 29: 817 (1969)
- RABES, H.M., R. HARTENSTEIN, und J. GMINDER: Nierentumoren durch Diäthylnitrosamin bei partiell hepatektomierten Ratten. *Naturwissenschaften* 2: 102 (1971)
- RABES, H.M., R. HARTENSTEIN, and P. SCHOLZE: Specific Stages of Cellular Response to Homeostatic Control During Diethylnitrosamine-Induced Liver Carcinogenesis. *Experientia* 26: 1356 (1970)
- RABES, H.M., R. HARTENSTEIN, and P. SCHOLZE: Hemmung der Proliferationsaktivität partiell resezierter Leber durch Diäthylnitrosamin. *Zschr. Krebsforsch.* 73: 239 (1970)

- RABES, H.M., P. SCHOLZE, and B. JANTSCH: Growth Kinetics of Diethylnitrosamine-induced, Enzyme-deficient Preneoplastic Liver Cell Populations in Vivo and in Vitro. Cancer Res. 32: 2577 (1972)
- RABES, H.M., und H.V. TUCZEK: Quantitative autoradiographische Untersuchungen zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. Virch. Arch. Abt. B Zellpath. 6: 302 (1970)
- RABES, H.M., und H.V. TUCZEK: Zellproliferation in der partiell resezierten Rattenleber nach akuter Intoxikation durch Allylformiat. Beitr. Path. 143: 14 (1971)
- RABES, H.M., R. WIRSCHING, und H.V. TUCZEK: Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie. Naturwissensch. 59: 221 (1972)
- RABES, H.M., R. WIRSCHING, H.V. TUCZEK, and G. ISELER: Analysis of Cell Cycle Compartments of Hepatocytes after Partial Hepatectomy. Cell Tissue Kinet. 9: 517 (1976)
- RABES, H.M., and C. ZETTLER: Relation between Preneoplastic Lesions, Cell Proliferation and Development of Carcinoma in the Liver after Discontinuous Application of Diethylnitrosamine. XI. Intern. Cancer Congress Florenz (1974)
- RAJEWSKY, M.F.: Changes in DNA Synthesis and Cell Proliferation during Hepatocarcinogenesis by Diethylnitrosamine. Europ. J. Cancer 3: 335 (1967)
- RAJEWSKY, M.F., W. DAUBER, and H. FRANKENBERG: Liver Carcinogenesis by Diethylnitrosamine in the Rat. Science 152: 83 (1966)
- RAPPAPORT, A.M.: Acinar units and the Pathophysiology of the Liver. In: The Liver, p.625, Academic Press, London (1963)
- REITH, A., B. SCHÜLER, und W. VOGEL: Quantitative und qualitative elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur des Leberläppchens normaler Ratten. Zschr. Zellforsch. 89: 225 (1968)

- REUBER, M.D.: Development of Preneoplastic and Neoplastic Lesions of the Liver in Male Rats Given 0.025 Percent N<sub>2</sub>-Fluorenyl-diacetamid. J. Nat. Cancer Inst. 34: 697 (1965)
- REUBER, M.D., and H.I. FIRMINGER: Morphologic and Biologic Correlation of Lesions Obtained in Hepatic Carcinogenesis in AxC Rats Given 0.025 Percent N-2-Fluorenyl-diacetamide. J. Nat. Cancer Inst. 31: 1407 (1963)
- ROE, F.C.J. and G. GRANT: Inhibition by Germ-free Status of Development of Liver and Lung of Mice Exposed neonatally to 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene: Implications in Relation to Tests for Carcinogenicity. Int. J. Cancer 6: 133 (1970)
- SHANK, R.C.: Effect of Dimethylnitrosamine on Enzyme Induction in Rat Liver. Biochem. J. 108: 625 (1968)
- SIGEL, B., L.B. BALDIA, S.A. BRIGHTMAN, M.R. DUNN, and R.I.M. PRICE: Effects of Blood Flow Reversal in Liver Autotransplants upon the Site of Hepatic Regeneration. J. Clin. Invest. 47: 1231 (1968)
- SLAGA, T.J., G.T. BOWDEN, B.G. SHAPAS, and R.K. BOUTWELL: Macromolecular Synthesis Following a Single Application of Alkylating Agents as Initiators of Mouse Skin Tumorigenesis. Cancer Res. 33: 769 (1973)
- SLIFKIN, M., L.P. MERKOW, S.M. EPSTEIN, and M. PARDO: The Cellular Analysis of Liver Carcinogenesis. VI. Growth and Ultrastructural Characteristics of N-2-Fluorenylacetamide Hyperplastic Liver Nodule Cell Growth in Vitro. Arch. Path. 94: 1 (1972)
- SNEIDER, T.W., and V.R. POTTER: Deoxycytidylate Deaminase and Related Enzymes of Thymidine Triphosphate Metabolism in Hepatomas and Precancerous Rat Liver. Advan. Enzyme Regulation 7: 375 (1969)
- SOROF, S., P.P. COHEN, E.C. MILLER, and J.A. MILLER: Electrophoretic Studies on the Soluble Proteins from Livers of Rats Fed Aminoazo Dyes. Cancer Res. 11: 383 (1951)

- SOROF, S., E.M. YOUNG, and P.L. FETTERMAN: Electrophoretic Distribution of 2-Acetylaminofluorene-9-C<sup>14</sup> Bound to Soluble Proteins of Rat Liver in Vivo. Exp. Cell Res. 20: 253 (1960)
- SYDOW, G., und F. FEY: Über die Glykogenose in der Rattenleber nach Einwirkung von Diäthylnitrosamin. Acta biol. med. germ. 23: 9 (1969)
- SCHAUER, A.: Histochemische und biochemische Untersuchungen bei der Cancerisierung mit Diäthylnitrosamin an der Rattenleber. Verh. Dtsch. Ges. Path. 50: 344 (1966)
- SCHAUER, A., und E. KUNZE: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 70: 252 (1968)
- SCHERER, E., and P. EMMELOT: Foci of altered Liver Cells Induced by a Single Dose of Diethylnitrosamine and Partial Hepatectomy: Their Contribution to Hepatocarcinogenesis in the Rat. Europ. J. Cancer 11: 145 (1975)
- SCHERER, E., and P. EMMELOT: Kinetics of Induction and Growth of Precancerous Liver-Cell Foci, and Liver Tumour Formation by Diethylnitrosamine in the Rat. Europ. J. Cancer 11: 689 (1975)
- SCHERER, E., and M. HOFFMANN: Probable Clonal Genesis of Cellular Islands Induced in Rat Liver by Diethylnitrosamine. Europ. J. Cancer 7: 369 (1971)
- SCHERER, E., M. HOFFMANN, P. EMMELOT, and M. FRIEDRICH-FREKSA: Quantitative Study on Foci of Altered Liver Cells Induced in the Rat by a Single Dose of Diethylnitrosamine and Partial Hepatectomy. J. Nat. Cancer Inst. 49: 93 (1972)
- SCHIEFERSTEIN, G., J. PIRSCHEL, W. FRANK und H. FRIEDRICH-FREKSA: Quantitative Untersuchungen über den irreversiblen Verlust zweier Enzymaktivitäten in der Rattenleber nach Verfütterung von Diäthylnitrosamin. Zschr. Krebsforsch. 82: 191 (1974)

- SCHMÄHL, D., R. PREUSSMANN, und H. HAMPERL: Leberkrebserzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten. *Naturwissensch.* 47: 89 (1960)
- SCHOLZE, P.: Proliferation und Histochemische Enzymaktivität normaler und präneoplastischer Zellpopulationen in der Leber während der Diäthylnitrosamin-induzierten Carcinogenese. Diss. München (1972)
- SCHREIBER, D., H. BATKA, R. WARZOK, and E. QUENTIN: Induction of Cardiac Tumours in Rats by Nitrosomethylurea. *Zentbl. allg. path. Anat.* 115: 31 (1972)
- SCHUBERT, J.C.F., und H. RINNEBERG: Der zytochemische Nachweis von Adenosintriphosphat spaltenden Fermenten bei pH 7,2 in menschlichen Knochenmarksausstrichen. *Blut* 8: 282 (1962)
- STEWART, H.L., and K.C. SNELL: The Histopathology of Experimental Tumors of the Liver of the Rat. *Acta Un. int. Cancer* 13: 770 (1957)
- STÖCKER, E.: Autoradiographische Studien zum Einfluß von Thioacetamid auf den zellulären Eiweiß- und Nukleinsäurestoffwechsel in Leberzellen der Ratte. *Beitr. path. Anat.* 129: 247 (1963)
- STÖCKER, E., und U. PFEIFER: Autoradiographische Untersuchungen mit  $^3\text{H}$ -Thymidin an der regenerierenden Rattenleber. *Zschr. Zellforsch.* 79: 374 (1967)
- TAPER, H.S., L. FORT, and J.M. BRUCHER: Histochemical Activity of Alkaline and Acid Nucleases in the Rat Liver Parenchyma during N-Nitrosomorpholine Carcinogenesis. *Cancer Res.* 31: 913 (1971)
- THOMAS, C.: Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte. *Zschr. Krebsforsch.* 64: 224 (1961)
- TOBEY, R.A., D.F. PETERSEN, and E.C. ANDERSON: Biochemistry of  $G_2$  and Mitosis. Edited by R. Baserge: *The Cell Cycle and Cancer*. New York, Marcel Dekker, p. 309 (1971)

- TUCZEK, H.V., und H.M. RABES: Verlust der Proliferationsfähigkeit der Hepatocyten nach subtotaler Hepatektomie. *Experientia* 27: 526 (1971)
- TUCZEK, H.V., W. SKORUPPA, und H.M. RABES: Zellkinetische Untersuchungen zur Interferenz zwischen Proliferations- und Funktionsstoffwechsel in der regenerierenden Rattenleber nach Applikation von Phenobarbital. *Virchows Arch. B Cell Path.* 17: 347 (1975)
- VASILIEV, J.M., and V.E. GUELSTEIN: Sensitivity of Normal and Neoplastic Cells to the Damaging Action of Carcinogenic Substances. *J. Nat. Cancer Inst.* 31: 1123 (1963)
- WACHSTEIN, M.: Enzymatic Histochemistry of the Liver. *Gastroenterology* 37: 525 (1959)
- WACHSTEIN, M. and E. MEISEL: On the Histochemical Distribution of Glucose-6-Phosphatase. *J. Histochem.* 4: 592 (1956)
- WACHSTEIN, M., and E. MEISEL: Histochemistry of Hepatic Phosphates at a Physiologic pH. *Amer. J. Clin. Path.* 27: 13 (1957)
- WARWICK, G.P.: Covalent Binding of Metabolites of Tritiated 2-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene to Rat Liver Nucleic Acids and Proteins, and the Carcinogenicity of the Unlabelled Compound in Partially Hepatectomised Rats. *Eur. J. Cancer* 3: 227 (1967)
- WEINBREN, K.: Regeneration of the Liver. *Gastroenterology* 37: 657 (1959)

## LEBENS LAUF

Am 6. Mai 1951 wurde ich als Tochter des städtischen Beamten Franz Metzger und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Behr in München geboren.

Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule und anschließend das Städtische Luisengymnasium in München, wo ich 1970 die Reifeprüfung bestand.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich an der Ludwig - Maximilians - Universität in München das Medizinstudium. Dort legte ich im Wintersemester 1972/73 die ärztliche Vorprüfung ab.

Nach sechs klinischen Semestern bestand ich im Sommer 1976 in München das medizinische Staatsexamen.

In den letzten 5 Monaten war ich als Medizinalassistentin am Parkhospital in München tätig.









